

## **5. DISCUSIÓN.**

Las glicosidasas son un grupo de enzimas hidrolíticas ampliamente distribuidas en los lisosomas de diversos tipos celulares que actúan a un pH ácido. Sin embargo, su presencia en forma soluble en fluidos orgánicos, como el FO, con un pH próximo a la neutralidad, y su posible función en el procesos de fecundación, no han sido aún claramente explicados (Tulsiani, 2006). En el presente trabajo se ha determinado y cuantificado la actividad de 7 exoglicosidasas en los fluidos oviductales de cerda y vaca en diferentes etapas del ciclo estral. Los resultados demuestran claramente que 5 de estas glicosidasas están activas en el fluido oviductal a lo largo de todo el ciclo estral de la vaca y la cerda con actividades enzimáticas variables, y por lo tanto, es posible que jueguen algún papel en el proceso reproductivo, como ha sido propuesto previamente (Tulsiani et al., 1996).

Obviamente, los numerosos experimentos que habrían sido necesarios para demostrar las distintas posibles funciones de cada una de estas enzimas no se han realizado porque exceden los objetivos del presente trabajo. No obstante, la discusión de los resultados que a continuación realizamos plantea algunas hipótesis con la intención de que sean corroboradas en futuros estudios. Algunas de estas hipótesis se basan en resultados previos que, en otras especies, o con otras glicosidasas (por ejemplo acrosomales), apuntan a que las enzimas aquí detectadas puedan realizar una función similar a la insinuada por los diferentes autores. Otras, probablemente más arriesgadas, intentan buscar una explicación razonable a la presencia de actividad enzimática detectada que, con los conocimientos actuales, puede resultar quizá inverosímil por la falta de antecedentes. En cualquier caso, hemos intentado, sobre la base de la actividad detectada para cada enzima en el fluido oviductal, y teniendo en cuenta las variaciones que se han observado a lo largo del ciclo estral, en su caso, ofrecer una visión lo más amplia posible de las funciones que podrían realizar en los distintos acontecimientos que tienen lugar en el oviducto.

Comenzando por la región del istmo, una de las primeras interacciones que se discute es la producida entre el espermatozoide y las células epiteliales del oviducto. Apoyándonos en los datos bibliográficos que demuestran la existencia de los sustratos adecuados para algunas enzimas en dicha interacción, se plantea la posibilidad de que éstas pudieran modularla. Igualmente, se discute el posible papel que pudieran tener algunas de las glicosidasas en los cambios que experimenta el espermatozoide durante el proceso de capacitación basándonos en la presencia de los carbohidratos descritos hoy día en su membrana. Ya en la ampolla oviductal, es también posible que las glicosidasas afecten a

la interacción espermatozoide-ZP, a la propia ZP de los ovocitos antes de la fecundación, que es rica en carbohidratos, o al proceso de decumulación que experimentan los ovocitos en su trayecto desde el infundíbulo hasta la unión ampular-ístmica. Lo que es evidente es que la exposición a un fluido en el que hemos detectado al menos 5 glicosidasas activas, de los complejos cúmulus-ovocito primero, los ovocitos desnudos más tarde, y los ovocitos unidos a espermatozoides finalmente, debe afectar a la composición glucídica de las diferentes células o cubiertas mencionadas, y en consecuencia a su interacción con otras células o membranas, sin olvidar el efecto que pudieran tener en los cigotos recién fecundados o en los embriones en sus primeras etapas de desarrollo.

Como hemos descrito en el apartado de revisión bibliográfica, los estudios de análisis enzimático de FO son escasos en la especie bovina y nulos en la porcina, lo que dificulta la comparación de nuestros resultados con los de otros investigadores. En consecuencia, la escasez de datos cuantitativos que se aportan es inevitable.

### 5.1. Neuraminidasa y $\alpha$ -D-galactosidasa.

Las dos glicosidasas para las que no se detectó actividad en ninguna de las etapas del ciclo, y en ninguna de las dos especies estudiadas fueron **neuraminidasa** y  **$\alpha$ -D-galactosidasa**. La primera de ellas, según un estudio reciente (Velásquez et al., 2007), podría estar implicada en el bloqueo de la polispermia en la especie bovina, ya que la adición de un inhibidor de esta enzima al medio de FIV aumentó significativamente el porcentaje de penetraciones polispérmicas. Este dato, junto con la demostración de la presencia de ácido siálico en la ZP bovina, y del papel del ácido siálico  $\alpha$ -2,3-unido a N-acetil-lactosamina en la unión del espermatozoide a la ZP, podría explicar la ausencia de actividad neuraminidasa en el fluido oviductal bovino. En efecto, lo contrario, es decir, la actividad neuraminidasa en el FOB, sería perjudicial para la fecundación, al eliminar receptores de la ZP de los ovocitos durante el tiempo que permanecen en contacto con el FOB y, en consecuencia, disminuir las posibilidades de ser fecundados. Es, por lo tanto, más plausible la hipótesis aportada por estos autores (Velásquez et al., 2007) de que la neuraminidasa se encuentre presente en el interior de los gránulos corticales y sólo sea liberada tras la penetración del primer espermatozoide, como consecuencia de la exocitosis de estas organelas.

En la especie porcina, la situación es similar, ya que se ha demostrado que la espermadhesina AWN-1 asociada a la membrana plasmática del espermatozoide de verraco se une preferentemente a oligosacáridos O-unidos con NeuAc  $\alpha$ (2-3/6)-Gal  $\beta$ (1-3)-GalNAc presentes en la ZP (Dostalova et al., 1995b). Por lo tanto, la actividad

neuraminidasa en fluido oviductal porcino tampoco sería, en teoría, deseable en los momentos cercanos a la fecundación pues eliminaría receptores potenciales en la ZP.

En cuanto a  **$\alpha$ -D-galactosidasa**, se ha encontrado actividad en fluidos orgánicos como el fluido uterino de rata siendo máxima en los momentos anteriores y posteriores a la ovulación actuando a pH ácido (Pizarro et al., 1984). Asimismo, se ha encontrado en plasma seminal de toro donde también despliega su actividad máxima a pH ácido (Jauhiainen y Vanha-Perttula, 1985), pero hasta nuestro conocimiento este es el primer trabajo describiendo la ausencia de actividad  $\alpha$ -D-galactosidasa en el FO de la especie porcina. En el FOB, sin embargo, ha sido estudiada por Roberts et al. (1975) pero su actividad fue menor que la detectada para esta enzima en el suero. Por otra parte, Parillo et al. (2000) identificaron, mediante estudios con lectinas, residuos de  $\alpha$ -D-galactosa sulfatada en la superficie más externa de la ZP bovina, caprina y porcina, mientras que este mismo azúcar unido a ácido siálico se detectó distribuido por toda la superficie de la ZP porcina. Aunque su mera presencia en la ZP no implica que participen en la unión con receptores del espermatozoide, sería interesante estudiar si la presencia de  $\alpha$ -D-galactosidasa en el fluido oviductal, tanto porcino como bovino, interferiría en la interacción espermatozoide-ovocito al eliminar azúcares presentes en la ZP con capacidad de actuar como receptores potenciales para el gameto masculino. Alternativamente la ausencia de actividad  $\alpha$ -D-galactosidasa podría deberse simplemente a la inexistencia de una función de esta enzima en el proceso de fecundación o en cualquier otra función oviductal.

## 5.2. $\alpha$ -L-fucosidasa.

La actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa ha sido descrita previamente en las membranas de espermatozoides de toro (Jauhiainen y Vanha-Perttula, 1986), rata (Avilés et al., 1996), humanos (Alhadeff et al., 1999) y cerdo (Hancock et al., 1993), y en diferentes tejidos del tracto reproductor bovino y porcino, pero en ninguna de estas dos especies ha sido demostrada ni cuantificada en fluido oviductal. No obstante, sí se ha observado actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa, con mayores niveles durante el estro y metaestro, en el fluido uterino de rata (Pizarro et al., 1984). Por el contrario, no hubo variaciones en la actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa de los fluidos oviductal y uterino durante los 4 días del ciclo estral en el hámster (Tulsiani et al., 1996). Los resultados obtenidos en el presente estudio para el FOB indican, como sucede con el hámster, que la actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa es semejante a lo largo del ciclo estral, con niveles medios de actividad específica de 39'7Unidades (U). En la cerda, sin embargo,  $\alpha$ -L-fucosidasa presenta su máxima actividad específica durante la fase folicular tardía (estro), alrededor del momento de la ovulación con 72'0U (Tabla 20) para descender significativamente durante la fase luteal temprana (33'0U), una vez la ovulación

se ha producido, y manteniéndose en niveles intermedios en las restantes fases. La actividad específica de  $\alpha$ -L-fucosidasa en el FOP tiene un valor medio de 50'36U. Podría parecer evidente, de acuerdo a estos resultados, que existen diferencias entre especies en cuanto a las variaciones de actividad observadas, aunque el significado fisiológico de estas diferencias se desconoce. Es posible que la diferente clasificación que fue necesario hacer para los oviductos de la especie bovina, debido a la disponibilidad de genitales en matadero, haya podido enmascarar las diferencias de actividad de esta enzima a lo largo del ciclo, y que con una mayor variabilidad de genitales podrían haberse observado. En la especie porcina, en la que sí se han observado diferencias, podría especularse que el patrón obtenido en su actividad en el fluido oviductal podría estar relacionado con las variaciones de los esteroides ováricos durante el ciclo (Buhi et al., 2000), ya que su máxima actividad coincide con las máximas concentraciones de estrógenos en sangre, y que esta enzima podría participar en algunas de las interacciones mencionadas anteriormente.

*Efecto de  $\alpha$ -L-fucosidasa sobre la interacción espermatozoide-células epiteliales del oviducto.*

Es de general aceptación que los espermatozoides de todas las especies de mamíferos estudiadas se acumulan en la porción caudal del istmo y permanecen en ese lugar hasta los momentos previos a la ovulación. Se especula que la constitución de ese reservorio es el producto de una fuerte asociación del gameto masculino con los residuos de carbohidratos de las células epiteliales oviductales (interacción ligando-receptor; Suárez et al., 1990). Datos experimentales indican que  $\alpha$ -L-fucosa es el carbohidrato responsable de la unión del espermatozoide a las células epiteliales del oviducto bovino (Lefebvre et al., 1997; Suárez et al., 1998). En la actualidad, se desconoce si  $\alpha$ -L-fucosidasa presente en el FOB interviene en la adhesión o separación de los espermatozoides a las CEO ya que, hasta nuestro conocimiento, este trabajo es el primero en describir esta actividad. Una hipótesis que podría plantearse es que  $\alpha$ -L-fucosidasa del FOB participe en la liberación de los espermatozoides capacitados del lugar de almacenamiento en la parte distal del istmo y les facilite ascender al sitio de fecundación en la región ampular-ístmica. De hecho, Lefebvre et al. (1997) han demostrado in vitro que el número de espermatozoides que se unen a las CEO disminuye cuando éstas han sido tratadas previamente con  $\alpha$ -L-fucosidasa. De manera análoga, esta enzima que escinde los enlaces glicosídicos de los residuos terminales de  $\alpha$ -L-fucosa de las glicoproteínas, podría incrementar su actividad en el momento de la ovulación ayudada por algún factor físico y escindir la interacción ligando-receptor. En efecto, Hunter (1995, 1996) ha señalado que en el momento de la ovulación la composición y las condiciones físicas del FO pueden ser modificadas por las

altas concentraciones de hormonas ováricas que llegan al oviducto transferidas desde la vena a la arteria ovárica, mediante un sistema de contra-corriente, sin la necesidad de conexiones vasculares directas. Además, Hunter y Nichol, (1986) midieron la temperatura del oviducto porcino 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. Por lo tanto, este aumento de temperatura podría permitirle a  $\alpha$ -L-fucosidasa del fluido oviductal aumentar discretamente su actividad y contribuir a la liberación de los gametos masculinos del reservorio de espermatozoides después de la capacitación. Recordemos que las enzimas doblan su velocidad de actividad por cada 10°C de aumento de temperatura (Lehninger, 2006a).

*Efecto de  $\alpha$ -L-fucosidasa sobre la remodelación de la ZP.*

Una hipótesis, alternativa a la del papel de  $\alpha$ -L-fucosidasa en la interacción espermatozoide-CEO, es que participara en los cambios que experimenta el ovocito tras ser liberado del folículo y alcanzar el oviducto, modificaciones que se corresponderían con lo que se ha denominado “maduración zonal” en el oviducto. Igualmente estas variaciones podrían ocurrir sobre la ZP de los cigotos y/o los embriones.

Recientemente, Venditti et al. (2007) han demostrado la presencia estable de una isoforma de  $\alpha$ -L-fucosidasa en el segmento ecuatorial y otras membranas del espermatozoide humano, sugiriendo un papel de esta enzima en la unión entre espermatozoide y ovocito. También Matsumoto et al. (2002) sugirieron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa media en la adhesión del espermatozoide a la ZP mediante una interacción de esta enzima con los residuos de L-fucosa en las glicoproteínas de la cubierta vitelina de los huevos del ascidio *Halocynthia roretzi*. Hipótesis similares podrían plantearse en *Drosophila*, donde se ha observado una  $\alpha$ -L-fucosidasa asociada a la membrana plasmática de los espermatozoides (Intra et al., 2006), y en la cerda y la mujer, donde se ha demostrado la presencia de L-fucosa en la zona pelúcida, gránulos corticales y espacio perivitelino de los ovocitos (Fléchon et al., 2003; Jiménez-Movilla et al., 2004).

Del mismo modo que en que ha sido demostrada la adhesión de diferentes glicoproteínas oviductales a la ZP (Hedrick et al., 1987; Kan et al., 1994; O'Day-Bowman et al., 2002),  $\alpha$ -L-fucosidasa presente en el FO podría contribuir en la “remodelación” de la ZP durante el tiempo de permanencia del ovocito en el oviducto, eliminando progresivamente los residuos de  $\alpha$ -L-fucosa, potenciales receptores del espermatozoide porcino, causando la pérdida de “fertilidad” del ovocito, ya que Parillo et al. (2003), en un estudio de unión de lectinas, encontraron que la ZP porcina contiene residuos de  $\alpha$ -L-fucosa. Igualmente,

Sant'Ana et al. (2005) en estudios con lectinas, hallaron diferencias regionales en la expresión de los carbohidratos entre los distintos segmentos del oviducto. Estos autores han demostrado que en las CEO de la cerda, la unión de la lectina UEA-1 (*Ulex europaeus agglutinin-1*), que reconoce principalmente residuos L-fucosa, es más fuerte en la ampolla durante la fase folicular (al final de la cual son ovulados los ovocitos), lo que indicaría que los glicoconjugados de las distintas regiones del oviducto desempeñan papeles específicos en funciones importantes como la maduración y nutrición de los gametos y la capacitación del espermatozoide (Walter y Bavdek, 1997). Esto podría explicar nuestra observación de máxima actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa en fase folicular tardía en cerdas púberes. En efecto, se ha encontrado que el tiempo que tardan los ovocitos porcinos en descender desde el ovario al sitio de fecundación es de 35 a 40 minutos (Hunter, 1974) y, también, que estos gametos tras ser expulsados del folículo tienen un tiempo de vida fecundable de 8-12 horas (Hafez y Hafez, 2002) y de 10-12 horas en la especie bovina (Hunter, 1982). Además, según Bernhard (1977), la velocidad óptima de catálisis de las enzimas a un pH próximo a la neutralidad, es del orden de 0'001 segundos (pudiendo variar en un orden de magnitud). Experimentalmente, el tiempo de acción de las glicosidasas no se ha establecido. Así por ejemplo, la incubación de embriones de ratona de 2 células con  $\beta$ -D-glucosidasa durante 30 minutos inhibió significativamente el transporte a través del oviducto de embriones transferidos cuando se comparan con los embriones no tratados enzimáticamente (Kim et al., 2002). Del mismo modo, Bold et al. (1989) obtuvieron en ratón disminuciones significativas en la unión espermatozoide-ovocito, al incubar durante 15 minutos los gametos masculinos con  $\alpha$ -L-fucosidasa antes de la inseminación artificial. En consecuencia, mientras los ovocitos se encuentran en suspensión en el FO en la ampolla oviductal la enzima  $\alpha$ -L-fucosidasa tendría el tiempo suficiente para "limpiar" parcialmente de la ZP los receptores para los espermatozoides volviéndola menos accesible a la penetración de los gametos masculinos.

#### *Efecto de $\alpha$ -L-fucosidasa sobre la capacitación espermática.*

En estudios previos se ha demostrado que los espermatozoides bovinos incubados en condiciones capacitantes adquieren proteínas y glicoproteínas del FO (McNutt et al., 1992; Rodríguez y Killian, 1998; Killian, 2004). Recientemente, Taitzoglou et al. (2007) han encontrado que los espermatozoides bovinos incubados con FOB reducen su número de sitios para la posterior unión a las lectinas, debido a la producción de cambios cuantitativos en la composición de los carbohidratos de la superficie del espermatozoide. La pérdida de unión del gameto masculino a las lectinas, causada por la incubación con FO, ocurre tanto antes como después de la capacitación. De acuerdo a Tulsiani et al. (1996) dos grupos de enzimas pueden causar modificaciones en la composición de las

glicoproteínas del espermatozoide, bien sea por la adición de carbohidratos (glicosiltransferasas) o por la hidrólisis de los azúcares terminales (glicohidrolasas) presentes en las secreciones del oviducto. En su trabajo Taitzoglou et al. (2007) encontraron que la unión de la lectina UEA-I a  $\alpha$ -L-fucosa se inhibió un 23% después de 3'5 horas de incubación en FOB. Estudios sobre la actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa en el FOB fueron realizados por Roberts et al. (1975) pero no encontraron actividad de esta enzima a lo largo del ciclo estral. En nuestros resultados hemos hallado que el FOB tiene actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa aunque sin variaciones a lo largo del ciclo (Tabla 13). Por lo tanto se podría pensar  $\alpha$ -L-fucosidasa del FOB es la responsable de la reducción de los sitios de unión por la lectina UEA-I observada en el espermatozoide bovino aunque esta hipótesis debería ser confirmada en futuros estudios.

### 5.3. $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa.

La enzima  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa ha sido implicada repetidamente en el proceso de fecundación. Sin embargo, su papel en las múltiples etapas de que consta este proceso ha sido materia de un amplio debate, porque ha sido comprometida en la unión y penetración a la ZP y en el bloqueo de la polispermia. Su presencia en el espermatozoide de cerdo (Song et al., 2000) y en el plasma seminal de toro (Khar y Anand, 1977a,b) también ha sido descrita, pero su función no ha sido establecida aunque se ha sugerido algún papel sobre las células del *cumulus oophorus*.

$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa ( $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa) ha sido identificada en el oviducto de gallina (Skolek et al., 1976; Droba et al., 2005), mediante el uso de métodos bioquímicos e histoquímicos. Asimismo, su presencia en el oviducto de codorniz (Skolek-Winnisch et al., 1977) y otras aves de corral (Solomon, 1979) ha sido descrita. Igualmente, en mamíferos, Pizarro et al. (1984) hallaron esta enzima en el útero de rata señalando que su nivel de actividad 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. La actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa ha sido también detectada en el FO de hámster (~22U/oviducto), donde se sugirió podría alterar las glicoproteínas del ovocito (Tulsiani et al., 1996). De igual forma, Roberts et al. (1976) han encontrado que la actividad de esta enzima en el fluido uterino de oveja es más alta que la del suero; empero, la actividad enzimática específica  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del fluido oviductal de esa especie durante el estro fue similar a la del suero (1U/mg proteína/1hr), mientras que durante el diestro y la preñez aumenta cuatro veces los niveles séricos (~4U/mg proteína/1hr), insinuando un papel en la modificación de la permeabilidad de la membrana y en la fase adhesiva de implantación del embrión. En

bovinos, Roberts et al. (1975) estudiaron la actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del fluido oviductal y encontraron los niveles más altos de actividad específica en la parte media del ciclo (~24U/mg proteína/1hr) disminuyendo durante el estro y la parte temprana del ciclo; no obstante, la función en el proceso de reproducción no fue establecida. Los resultados originados del presente estudio señalan que esta glicosidasa no presenta oscilaciones en su actividad específica en las dos fases estudiadas, con resultados medios en la vaca de 88'4U/mg proteína (Tabla 14), lo que difiere de los datos de Roberts et al. (1975). Posibles argumentos para explicar estas diferencias podrían ser el método de obtención de nuestras muestras de FO (aspiración) frente al de estos autores (canulación), así como el tiempo de almacenamiento de las muestras, aunque este dato no es aportado en el trabajo de Roberts et al. (1975).

Por lo que se refiere a  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en el fluido oviductal porcino, hasta la fecha no había sido demostrada ni cuantificada. Esta enzima en el FOP, presenta su máxima actividad específica durante la fase folicular tardía (91'9U, Tabla 20), antes del momento de la ovulación, y decrece durante la fase luteal temprana (metaestro) a 38'3U. Estos cambios estarían regulados hormonalmente, ya que se ha descrito que los diferentes niveles hormonales afectan a la secreción de proteínas y/o enzimas en el oviducto (Buhi et al., 2000).

#### *Efecto de $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa sobre la interacción espermatozoide-células epiteliales del oviducto.*

Trabajos realizados con lectinas han detectado la presencia de  $\beta$ -N-acetil-glucosamina en el glucocáliz de las células del epitelio oviductal porcino (Walter y Bavdek, 1997; Sant'Ana et al., 2005). La unión más fuerte entre la lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*, con afinidad por  $\beta$ -(1-4)-GlcNAc y NeuNAc) y  $\beta$ -N-acetil-glucosamina se lleva a cabo en el istmo durante la fase folicular del ciclo estral lo que indicaría un papel de este monosacárido en la capacitación del gameto masculino (Walter y Bavdek, 1997). Como quiera que la adhesión de los espermatozoides a las células epiteliales oviductales (CEO) se ha demostrado que está mediada por carbohidratos (Suárez, 1990) y dado que la N-acetil-glucosamina tiene más reacción con la lectina en la fase folicular del ciclo, se podría plantear que este monosacárido participe en la formación del reservorio espermático porcino. Los resultados de este trabajo muestran que el FOP tiene gran actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa durante la fase folicular tardía del ciclo estral (Tabla 18). Hasta nuestro conocimiento estudios sobre la actividad de esta enzima no se habían realizado, por lo que se podría especular que esta exoglicosidasa, como ya propusimos para  $\alpha$ -L-fucosidasa, participe en la liberación de los espermatozoides capacitados del reservorio

espermático, ya que esta enzima hidroliza los enlaces glicosídicos de los residuos terminales de N-acetil-glucosamina en las glicoproteínas. Quedaría, no obstante, por demostrar la participación de N-acetil-glucosamina en la unión espermatozoide-CEO.

*Efecto de  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa sobre las células del cumulus oophorus.*

Las células del *cumulus* están rodeadas por una matriz rica en glicosaminoglicanos (Wolf, 1982; Zhuo y Kimata, 2001) y la ZP está constituida por glicoproteínas (Nakano, et al., 1990; Noguchi et al., 1992). De acuerdo con Takada et al. (1994)  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa (ácida) presente en el acrosoma del espermatozoide porcino y liberada tras una reacción acrosómica (RA) parcial, tiene la capacidad de dispersar las células del *cumulus* a un pH fisiológico de manera similar a como lo hace la hialuronidasa, que teniendo un pH óptimo de 4'0 (Zaneveld et al., 1973), mantiene la habilidad de dispersar las células del *cumulus* en un medio de cultivo a pH 7'4 (McClellan et al., 1942). Sin embargo, la participación de las glicosidasas del FO en esta función no ha sido estudiada. En este trabajo, encontramos que el FOP tiene mayor actividad específica  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en la fase folicular tardía del ciclo estral (Tabla 20), de tal forma que los ovocitos, que irían descendiendo paulatinamente por la ampolla oviductal, se encontrarían con altos niveles de la enzima. Por lo tanto, podría especularse que la  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa participa en la dispersión de las células del *cumulus* facilitando el paso del espermatozoide para unirse a la ZP. Sin embargo, para que la  $\beta$ -hexosaminidasa acrosomal pueda actuar en la dispersión de las células del *cumulus* debe producirse previamente la RA y si esto sucede esta glicosidasa tendría acción sobre la ZP y no sobre las células del *cumulus*. Además, si bien es cierto que los espermatozoides reaccionados de humanos (Morales et al., 1989) y cobayo (Myles et al., 1987), entre otras especies, tienen la capacidad de unirse a la ZP, en la especie porcina esta situación no está muy clara. Por ejemplo, Fazeli et al. (1997) han observado que los espermatozoides de cerdo que se unen a la ZP homóloga son aquellos que poseen intacta su membrana plasmática. Al mismo tiempo, la actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en las especies politocas, como la cerda, que ovulan muchos ovocitos ayudaría a la dispersión de las células del *cumulus*. Además, Rodger y Young (1981) observaron que durante el paso del espermatozoide a través del *cumulus*, varias glicosidasas actúan simultáneamente para dispersar estas células. En consecuencia, la  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del FOP, que se encuentra inmersa en su medio natural y dado que su mayor actividad específica la presenta en los momentos próximos a la ovulación, podría facilitar el paso de los espermatozoides para alcanzar la ZP porcina disgregando las células del *cumulus*, quedando para  $\beta$ -hexosaminidasa acrosomal el papel comentado en la penetración de la ZP.

*Efecto de la  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa sobre la unión espermatozoide-ovocito.*

En la especie murina, el reconocimiento espermatozoide-ovocito es mediado por la unión de la enzima  $\beta$ -1,4-galactosil-transferasa (GalTasa), localizada en la parte lateral de la membrana plasmática (MP) del espermatozoide, con residuos del azúcar  $\beta$ -N-acetil-glucosamina de la ZP3 del ovocito (Bleil y Wassaman, 1980; Shur, 1991; Miller et al., 1992). También Larson y Miller (1997) encontraron que GalTasa se expresa en la MP tanto del espermatozoide de toro como del verraco. La adhesión inicial de la ZP induce la RA en el espermatozoide (Florman et al., 1984), cuyo contenido se cree digiere parte de la ZP para que el espermatozoide penetre y llegue hasta el oolema. Sin embargo, López y Shur, (1987) encontraron que GalTasa es retenida por el espermatozoide durante la RA al migrar a la parte lateral de la cabeza espermática. De tal manera que el contenido del acrosoma es liberado con el espermatozoide aún unido a la superficie de la zona. En consecuencia, según Lathrop et al., (1990) puede haber un espermatozoide totalmente reaccionado adherido a la zona por su superficie lateral, comprometiéndose la unión secundaria a otras proteínas de la ZP. Posteriormente, mediante estudios bioquímicos y de inmunofluorescencia indirecta, Miller et al. (1993b) observaron que en el acrosoma hay actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa y es liberada durante la RA. Al mismo tiempo, encontraron que tras la exocitosis  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa también facilita la incursión del espermatozoide a través de la ZP al eliminar los receptores de la ZP del ovocito. Esta enzima acrosomal sería necesaria para evitar que GalTasa se reasocie con residuos de N-acetil-glucosamina que impedirían la iniciación o el progreso de la penetración de la zona (Miller et al., 1993b). Estos hechos podrían explicar la presencia de esa exoglicosidasa en el acrosoma y su función en el proceso de la fecundación.

Sin embargo, la razón de la actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del fluido oviductal bovino y porcino se desconoce. Una hipótesis que podría esbozarse es que la enzima  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa oviductal, de forma análoga a como se ha propuesto para la acrosomal, hidrolize parcialmente los residuos  $\beta$ -N-acetil-glucosamina de la glicoproteínas de la ZP bovina y porcina y que potencialmente podrían interactuar con la GalTasa del espermatozoide reaccionado y, por lo tanto, impedirle la penetración a través de la zona.

En su estudio, Miller et al. (1993b) proponen que  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa acrosomal podría funcionar de dos maneras: a) catalíticamente hidrolizando residuos de N-acetil-glucosamina durante la penetración de la ZP o, b) actuando como una lectina y enmascarando residuos N-acetil-glucosamina y, por lo tanto, bloqueando la unión de GalTasa con la ZP (Miller et al., 1993b), como previamente habían propuesto Goldstein et al. (1980). No obstante, hay dos hechos que podrían apoyar la hipótesis de una acción

preferente de  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa oviductal sobre la acrosomal: a) como todas las glicosidasas lisosomales,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa acrosomal tiene mayor actividad a pH ácido, empero baja a pH 7'4 como es el escenario donde se lleva a cabo la fecundación y, b) el pH de la ampolla oviductal porcina en el momento de la ovulación aumenta 0'4 unidades debido a la alcalinidad del fluido folicular (Nichol et al., 1997). Asimismo, es sabido que desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo de las enzimas pueden afectar drásticamente la actividad enzimática (Lehninger, 2006a). Es muy probable, en consecuencia, que estos hechos circunstanciales permitan que  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del FO, que se encuentra inmersa en su medio natural, actúe catalíticamente facilitando la penetración del espermatozoide a través de la zona, al prevenir que GalTasa del espermatozoide interactúe con los residuos  $\beta$ -N-acetil-glucosamina de la ZP del ovocito.

#### *Acción de $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa sobre la remodelación de la ZP.*

Así como para  $\alpha$ -L-fucosidasa hemos propuesto que podría participar en la remodelación de las glicoproteínas de la ZP, esa hipótesis podría también ser válida para otras exoglicosidasas, como la  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa, que presentan actividad en el FO tanto para la especie bovina como porcina. Del mismo modo, el posible efecto del cambio de la temperatura oviductal en los momentos cercanos a la ovulación (Hunter y Nichol, 1986) también podría verse aplicado a esta enzima.

#### *Efecto de $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa sobre la capacitación del espermatozoide.*

Recientemente, Taitzoglou et al. (2007) encontraron que cuando los espermatozoides bovinos se incuban con FOB durante 30 minutos, la lectina WGA disminuye en el 91% su afinidad por la N-acetil-glucosamina espermática. Esta reducción de afinidad de la lectina pudo ser producida por la hidrólisis de los monosacáridos de la membrana del espermatozoide causada por las glicohidrolasas presentes en el FO. Estudios sobre la actividad  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa en el FOB han sido realizados por Roberts et al. (1975), como se mencionó anteriormente. En este trabajo, también, hemos encontrado actividad de esta enzima (Tabla 13), sin modificaciones a lo largo del ciclo. La enzima  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa del FOB, similarmente a lo propuesto para  $\alpha$ -L-fucosidasa, podría ser la responsable de la inhibición de la unión de la lectina WGA a N-acetil-glucosamina en el espermatozoide bovino cuando se incubaba con FOB. Podría especularse, por lo tanto, que participa en el proceso de capacitación del espermatozoide mediante la remodelación de la membrana plasmática de ésta célula, aunque serían necesarios futuros estudios para corroborar esta hipótesis.

#### 5.4. $\beta$ -D-galactosidasa.

La enzima  $\beta$ -D-galactosidasa se ha localizado en la superficie del espermatozoide, en la región postacrosomal (Chayco et al., 2000) y en el acrosoma (Skudlarek et al., 2000). Tras la inducción de la RA por la ZP, esta enzima permanece asociada a la membrana acrosomal y a la región postacrosomal del espermatozoide. Su presencia en el fluido oviductal bovino ya había sido estudiada por Roberts et al. (1975) quienes no observaron actividad. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio señalan que sí hubo actividad de esta enzima en el FOB aunque sin variaciones entre las fases folicular y luteal (Tabla 14), siendo los valores medios a lo largo del ciclo de 65'3U.

La actividad  $\beta$ -D-galactosidasa en el fluido oviductal porcino no ha sido estudiada previamente. No obstante, ha sido detectada actividad de esta enzima en el FO de otras especies como hámster (18U/oviducto), donde se sugirió que podría alterar las glicoproteínas del espermatozoide durante la capacitación (Tulsiani et al., 1996), codorniz (Skoleck-Winnisch et al., 1977) y gallina (0'63mU/mg proteína) en el que su papel biológico no es claro (Droba et al., 2005). Por lo que respecta a nuestro estudio,  $\beta$ -D-galactosidasa del FOP alcanza su nivel máximo en la fase folicular temprana (34'3U).

*Efecto de  $\beta$ -D-galactosidasa sobre la interacción espermatozoide-células epiteliales del oviducto.*

En la especie porcina, Green et al. (2001) han demostrado la presencia de lactosamina en las células epiteliales oviductales, sugiriendo un rol de este disacárido en la interacción entre este epitelio con los gametos masculinos y en la constitución del reservorio de espermatozoides. Un hecho de universal aceptación es la participación de  $\beta$ -D-galactosidasa en la hidrólisis de N-acetil-lactosamina para dar  $\beta$ -D-galactosa como uno de los productos, por lo que esta enzima podría actuar en la liberación de los espermatozoides, en el caso de que  $\beta$ -D-galactosa fuera un receptor para los mismos en las CEO. Además, la pérdida parcial de esos receptores, podría ser la causa de que algunos no se "anclen" en las CEO y continúen directa y rápidamente hacia la región ampular-ístmica, sin llevar a cabo el proceso de capacitación, en lo que se conoce como la "fase rápida de transporte espermático". De hecho se estima que estos espermatozoides, no involucrados en la fecundación, demoran 15 minutos en aparecer en el oviducto tras ser depositados en la hembra (Overstreet y Cooper, 1978).

*Efecto de  $\beta$ -D-galactosidasa sobre las células epiteliales del oviducto.*

Otra hipótesis, aunque bastante arriesgada, que podría sugerirse es que esta enzima hidrolizaría sólo algunas de las moléculas de lactosamina que forman parte de las células epiteliales oviductales produciendo  $\beta$ -D-galactosa libre y, al mismo tiempo, eliminando algunos receptores de espermatozoides puesto que su mayor actividad se presenta en la fase folicular cuando fisiológicamente no se encuentran ovocitos ni embriones en el oviducto. De modo semejante a como ha sido establecida la contribución de la glucosa presente en el fluido oviductal como aporte energético (Leese, 1983), las moléculas de  $\beta$ -D-galactosa liberadas proporcionarían también la energía necesaria para el mantenimiento de los ovocitos y/o espermatozoides o, incluso, del embrión en sus primeras etapas de desarrollo. De hecho, la primera fase de la glicólisis denominada “fase preparatoria o de recogida” incorpora al sistema, además de glucosa, otros monosacáridos como galactosa (Lehninger, 2006b). Adicionalmente, Nichol et al. (1992) han hallado que en el FOP los niveles de glucosa disminuyen drásticamente después de la ovulación. Por otro lado, se ha demostrado en embriones humanos cultivados *in vitro* que el consumo de glucosa aumenta aproximadamente de 8-14 pmol/embrión/hora entre los días 2'5 y 4'5 y, posteriormente, se incrementa a 24 pmol/embrión/hora en el día 5 (Hardy et al., 1989). Entonces, es razonable pensar que los espermatozoides se “surtan” de este metabolito ( $\beta$ -D-galactosa) durante la etapa folicular, como sugieren Fleming et al (2005) al demostrar que los espermatozoides porcinos que internalizan macromoléculas que exhiben galactosa aumentan su capacidad fecundante y sufren menos estrés oxidativo. La “digestión” parcial de receptores de espermatozoides se efectuaría por un mecanismo de autorregulación de la enzima ( $\beta$ -D-galactosidasa) igual o similar al que existe en algunas vías metabólicas como la conocida inhibición alostérica o por el producto final ( $\beta$ -galactosa).

#### *Efecto de $\beta$ -D-galactosidasa sobre la remodelación de la ZP.*

En hipótesis anteriores, planteadas para las enzimas  $\alpha$ -L-fucosidasa y  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa hemos propuesto la posibilidad de su participación en la reestructuración de la cubierta glicoprotéica que protege al ovocito. Del mismo modo, en la especie bovina, la  $\beta$ -D-galactosidasa podría modificar las glicoproteínas de la ZP del ovocito, debido a que recientemente, Parillo et al. (2000) han localizado residuos sulfatados de  $\beta$ -galactosa unida a N-acetil-galactosamina (SO<sub>4</sub>-Gal $\beta$ -1,3GalNAc) en la superficie externa de la ZP bovina y ovina e, igualmente, el mismo sulfoglicano enlazado a la N-acetil-glucosamina (SO<sub>4</sub>-Gal $\beta$ -1,4GlcNAc) en la ZP bovina, ovina y caprina insinuando la participación de  $\beta$ -D-galactosa en la interacción entre los gametos en estas especies.

### 5.5. $\alpha$ -D-manosidasa.

Esta enzima ha sido descrita previamente en el espermatozoide de ratas (Tulsiani et al., 1989), ratón (Corwall et al 1991) y cerdo en donde exhibe su actividad principalmente en la matriz acrosomal y en la membrana interna del acrosoma, a pH fisiológico (7-8; Song et al., 2000). En el tracto reproductor femenino se ha encontrado actividad  $\alpha$ -manosidasa en el útero de la rata con mayores niveles en el estro y el metaestro (Pizarro et al., 1984) y en fluido oviductal de hámster con una actividad de ~9U/oviducto (Tulsiani et al., 1996), codorniz (Skoleck-Winnisch et al., 1977) y gallina (Sukeno et al., 1972; Hamagashira et al., 1996), especulando que participa en el catabolismo de las glicoproteínas. Al igual que para otras exoglicosidasas, su presencia en el FOB ya había sido estudiada por Roberts et al. (1975) quienes observaron una actividad ligeramente mayor a las trazas de actividad detectadas para esta enzima en el plasma sanguíneo. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que esta enzima presenta en la vaca su máxima actividad específica durante la fase folicular del ciclo estral (92'8U, Tabla 14), para descender ligeramente en la fase luteal (83'1U). Esta observación coincide con los resultados de Pizarro et al. (1984) que también describen una mayor actividad  $\alpha$ -D-manosidasa en la fase folicular. Hasta donde nos consta, su actividad en el FOP no había sido estudiada. En nuestros resultados, la actividad específica  $\alpha$ -D-manosidasa del FOP fue mayor en la fase folicular temprana (proestro) (104'4U, Tabla 20) disminuyendo paulatinamente a medida que el ciclo progresa, hasta alcanzar su nivel más bajo en el diestro (71'4U).

En general, en los resultados obtenidos en este trabajo observamos que la actividad  $\alpha$ -D-manosidasa comparada con las demás exoglicosidasas tanto del FOB (Tabla 13) como del FOP (Tabla 20), presenta los mayores valores absolutos. Es posible que la razón de estos resultados sea porque la  $\alpha$ -D-manosidasa es la única que actúa a un pH óptimo fisiológico ya que este estudio se realizó al pH del fluido oviductal. Esto coincide con un trabajo previo realizado por Song et al. (2000) en el que observaron que esta enzima exhibe su actividad a pH fisiológico (7-8), mientras que otras glicosidasas desplegaron su actividad a pH ácido.

#### *Efecto de $\alpha$ -D-manosidasa sobre la unión espermatozoide-ZP.*

Como se ha sugerido anteriormente para otras glicosidasas, también  $\alpha$ -D-manosidasa podría realizar cambios en la superficie externa de la ZP de los ovocitos bovinos ya que Amari et al. (2001) han hallado residuos de  $\alpha$ -manosa como receptores de espermatozoides en la ZP del ovocito de vaca.

En general, las enzimas pueden actuar de forma independiente o realizar las reacciones metabólicas constituyendo cadenas de enzimas que operan de forma cooperativa, de tal manera que el producto de la catálisis de una enzima es el sustrato de la siguiente (Lehninger, 2006a). Por otra parte, las exoglicosidasas se caracterizan por escindir los enlaces glicosídicos de los azúcares terminales que constituyen cadenas de oligosacáridos en las glicoproteínas, glicolípidos y glicosaminoglicanos (Kornfeld y Mellman, 1989). Como ya se mencionó, Amari et al. (2001) encontraron que la  $\alpha$ -D-manosa es el azúcar receptor del espermatozoide en la ZP bovina. Igualmente, Parillo et al. (2000) hallaron residuos  $\text{SO}_4$ -gal-(1,4)-galNAc en la ZP bovina. En los resultados de nuestro trabajo, se observa que  $\alpha$ -D-manosidasa presenta en la vaca su máxima actividad cerca del momento de la ovulación debido a que los tractos reproductores obtenidos en el matadero eran de novillas con folículos dominantes a punto de ovular, lo que coincide con el estudio de Pizarro et al. (1984) en ratas. Existe, también en este estudio, una correlación fuertemente positiva entre  $\alpha$ -D-manosidasa y  $\beta$ -D-galactosidasa (Tabla 17). Los anteriores resultados sugieren que estas dos enzimas podrían actuar en tándem modificando la composición de los azúcares de las glicoproteínas de la ZP bovina al eliminar, la primera ( $\alpha$ -D-manosidasa) los residuos de  $\alpha$ -D-manosa y, la segunda ( $\beta$ -D-galactosidasa) los azúcares terminales  $\text{SO}_4$ -gal-(1,4)-galNAc, lo cual tornaría a la ZP de difícil acceso para los espermatozoides, debido a que estas enzimas eliminarían los receptores de los gametos masculinos. Esta correlación positiva entre ambas enzimas también se ha observado en el caso de la especie porcina (Tabla 26) donde la ZP también posee residuos  $\alpha$ -D-manosa (Parillo et al., 2003) y  $\beta$ -D-galactosa (Yonezawa et al., 2005).

#### *Efecto de $\alpha$ -D-manosidasa sobre la interacción espermatozoide-células epiteliales del oviducto.*

La presencia de carbohidratos en las proteínas y los lípidos de las membranas celulares le da la opción a las glicosidasas presentes en el FO de hidrolizar esos azúcares y desempeñar potenciales funciones en el proceso de fecundación como modificar la permeabilidad de las membranas y jugar un papel en la fase adhesiva de implantación (Parker et al., 1974). Dentro de las funciones que se le atribuyen a los azúcares está la de actuar como receptores de los espermatozoides en la interacción con las CEO. En este sentido, Wagner et al. (2002) y Green et al. (2001) hallaron que en la cerda los azúcares  $\alpha$ -D-manosa y lactosamina desempeñan este papel. La lactosamina es un disacárido constituido por  $\beta$ -D-galactosa y  $\beta$ -D-glucosamina y el enlace entre estos dos monosacáridos es hidrolizado por la  $\beta$ -D-galactosidasa. Los resultados de este estudio, muestran que en los suinos los mayores valores de actividad específica se presentan en la fase folicular del ciclo estral tanto para la  $\alpha$ -D-manosidasa como para la  $\beta$ -D-

galactosidasa (Tabla 20). Como en la hipótesis anterior, estas dos enzimas podrían actuar de forma conjunta escindiendo los receptores de espermatozoides en las CEO: la  $\alpha$ -D-manosidasa los azúcares terminales de  $\alpha$ -D-manosa y la  $\beta$ -D-galactosidasa liberando la  $\beta$ -D-galactosa que forma parte de la lactosamina.

En este apartado se esboza otro posible efecto de  $\alpha$ -D-manosidasa sobre las CEO, debido a que Benoff et al. (1993a) encontraron que durante la capacitación aparece en el espermatozoide humano una proteína de unión a manosa asociada a la membrana plasmática externa del acrosoma. Además, como se ha mencionado en otro apartado de esta discusión, se ha encontrado que en las CEO los residuos de  $\alpha$ -D-manosa son los receptores de los espermatozoides porcinos (Wagner et al., 2002). Por lo anterior, de forma análoga a lo que ocurre en la especie humana,  $\alpha$ -D-manosidasa, en la cerda, podría actuar como proteína de unión del espermatozoide porcino a las CEO, ya que en este trabajo presenta la mayor actividad específica en la fase folicular del ciclo cuando fisiológicamente se podrían encontrar los gametos masculinos pudiendo adherir la enzima del FO a la membrana plasmática externa del acrosoma.

#### *Efecto de $\alpha$ -D-manosidasa sobre la capacitación del espermatozoide.*

Como se ha mencionado anteriormente para otras exoglicosidasas, la incubación de los espermatozoides bovinos con FO produce un descenso de la afinidad de ciertas lectinas por los azúcares de su membrana. Taitzoglou et al. (2007), encontraron que después de 30 minutos de incubación con FOB no luteal la lectina Con-A (*Concanavalin A*, que reconoce principalmente residuos de  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -glucosa) declinó un 76% su afinidad por  $\alpha$ -D-manosa, probablemente por acción de las glicosidasas del FO sobre las glicoproteínas del espermatozoide. Estudios sobre  $\alpha$ -D-manosidasa en el FOB, como se expresó en otro apartado, han sido realizado por Roberts et al. (1975) pero no se encontró actividad enzimática. Nuestros resultados muestran que en el FOB hay actividad (Tabla 13), sin modificaciones durante el ciclo estral. Teniendo en cuenta nuestros resultados, la disminución de la afinidad de la lectina Con-A por  $\alpha$ -D-manosa en el espermatozoide bovino pudo ser causada por la presencia de  $\alpha$ -D-manosidasa del FOB que hidroliza los enlaces de los residuos de  $\alpha$ -D-manosa en las cadenas de oligosacáridos.

#### **5.6. $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa.**

La presencia de  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa ha sido detectada en el plasma seminal bovino, porcino y humano (Khar y Anand, 1977a; Daron y Aull, 1985; Kapur y Gupta, 1986). En *Drosophila* la enzima  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa había sido localizada

asociada a la membrana plasmática del espermatozoide insinuando un papel en la interacción entre los gametos (Cattaneo et al., 2002). En el tracto reproductor femenino, Roberts et al. (1976) han localizado actividad  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa en los fluidos uterino, con mayores niveles durante el diestro (579 $\mu$ g sustrato/mg proteína/hora) y la gestación (1.217 $\mu$ g sustrato/mg proteína/hora), y en el oviductal ovino con actividad durante estro similar a la obtenida para el suero (1'1 $\mu$ g sustrato/mg proteína/hora) incrementando 4 veces en las etapas mencionadas anteriormente para ésta actividad en el útero (diestro y gestación), señalando que esta enzima podría tener control en el desarrollo embrionario temprano alterando la permeabilidad de la membrana e iniciando la fase adhesiva de implantación. Su presencia en el FOB también ha sido estudiada por Roberts et al. (1975), presentando variaciones a lo largo del ciclo estral, con mayor actividad durante la fase luteal (~4'0 $\mu$ g sustrato/mg proteína/hora), mientras que durante el estro y la parte temprana del ciclo fueron similares a los del suero (1'0 $\mu$ g sustrato/mg proteína/hora). En este estudio no se compara la actividad entre las distintas fases del ciclo y no se establece una función para esta glicosidasa en el proceso de reproducción. En nuestro caso observamos mayor actividad específica  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa en la fase folicular (66'5U, Tabla 13) que en la luteal (59'4U).

Sin embargo, al igual que otras exoglicosidasas su presencia en el fluido oviductal porcino no ha sido demostrada ni cuantificada con anterioridad. Los resultados de este trabajo indican que en la cerda,  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa presenta su mayor actividad específica en el proestro (69'8U, Tabla 20) y luego disminuye paulatinamente a medida que el ciclo progresa. Pudiera pensarse que tanto en bóvidos como en suinos la actividad  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa del FO podría estar relacionada con el incremento de la secreción de esteroides, específicamente por el aumento de la secreción de estradiol y la simultánea disminución de progesterona (Abe et al., 1998) y que esta enzima pudiera desempeñar algún papel en alguno de los procesos mencionados al principio de esta discusión.

#### *Efecto de $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa sobre las células epiteliales del oviducto.*

En otros apartados se ha mencionado que mediante estudios con lectinas se han identificado algunos monosacáridos en la mucosa oviductal porcina. Entre ellos, Sant'Ana et al. (2005) han descrito el patrón y número de sitios de unión de varias lectinas a las distintas regiones oviductales observando que durante la fase folicular no existen en el istmo sitios de unión para la lectina DBA (*Dolichos Biflorus agglutinin*, que reconoce principalmente residuos  $\alpha$ -GalNAc), mientras que en la fase luteal aparece un marcado aumento de estos sitios. De todas las lectinas estudiadas, DBA es la única que no

presentó sitios de unión en el istmo durante la fase folicular pero sí en la fase luteal. En nuestro trabajo encontramos que el FOP posee actividad  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa durante la fase luteal del ciclo (Tabla 18) por lo que esta exoglicosidasa podría eliminar los residuos N-acetil-galactosamina que aparecen en el istmo modificando así los monosacáridos de las glicoproteínas de esta región en fase luteal. Esto nos llevaría a pensar en una posible acción de esta enzima en el transporte oviductal del embrión en desarrollo antes de su entrada en el útero e implantación, ya que  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa catalizaría la hidrólisis de los residuos de este monosacárido en las cadenas de oligosacáridos de las CEO.

*Efecto de  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa en la remodelación de la ZP.*

De modo semejante a como se ha sugerido para otras exoglicosidasas como  $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa y  $\alpha$ -D-manosidasa, también la  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa podría actuar en la remodelación de la superficie externa de la ZP debido a que Parillo et al. (2000) han encontrado residuos de galactosamina sulfatada ( $\text{SO}_4$ -galactosamina) en la ZP bovina.

*Efecto de  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa sobre la capacitación del espermatozoide.*

En recientes estudios realizados por Taitzoglou et al. (2007), se descubrió una pérdida del 75% de la unión entre la lectina BS-I (*Bandeiraea simplicifolia agglutinin-1* que reconoce principalmente residuos  $\alpha$ -galactosa y N-acetilgalactosamina), y el monosacárido  $\beta$ -N-acetil-galactosamina, cuando los espermatozoides bovinos se incuban durante 30 minutos con FOB obtenido previo o al momento de la ovulación. Como también hemos mencionado para otras lectinas, esta inhibición podría ser debida a la eliminación de algunos monosacáridos presentes en la superficie del espermatozoide por acción de las glicosidasas oviductales. Roberts et al. (1975) encontraron, como ya se ha anotado, actividad  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa en el FOB. En este estudio también hemos encontrado actividad de esta enzima a lo largo del ciclo estral (Tabla 13). Se puede especular, igualmente, que la actividad  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa del FOB esté comprometida en la disminución de la afinidad de BS-I por el monosacárido  $\beta$ -N-acetil-galactosamina en los espermatozoides incubados con FOB al eliminar los sitios de unión de la lectina, participando por tanto en el proceso de capacitación.

### 5.7. Proteínas y volumen de fluido oviductal.

La cantidad total, el contenido y la concentración de proteínas en el FO ha sido medida en numerosas especies de mamíferos y empleando una gran variedad de técnicas (Hunter, 1988). En este aspecto, Leese (1988) determinó que la concentración de proteínas en el FO es aproximadamente un 10-15% de su concentración en el suero. Estas proteínas derivan de la trasudación de la mucosa y de las secreciones de las células epiteliales.

Los estudios relacionados con la determinación de la cantidad de proteínas en el FOB son contradictorios y con grandes variaciones individuales dependiendo igualmente de la etapa del ciclo estral. Killian et al. (1989), en 4 vacas canuladas encontraron que la cantidad de proteínas totales secretadas diariamente en el FOB es mayor durante la fase no luteal, empero la concentración de proteínas es menor durante esta misma fase debido al aumento de volumen. En otro trabajo, llevado a cabo igualmente en hembras canuladas, Ehrenwald et al. (1990), descubrieron que la concentración de proteínas del FOB aumenta al momento del estro, cuando la cantidad de progesterona del suero disminuye. El valor medio de la concentración de proteínas es de 21'3mg/ml, cuando la concentración de progesterona es menor de 0'5ng/ml, y 6'9mg/ml cuando la progesterona sérica es mayor de 0'5ng/ml. En otros estudios en FOB de 2 vacas canuladas, Carlson et al. (1970) hallaron que la concentración de proteínas fue de 0'83mg/ml y 1'58g/ml para cada vaca, pero Stanke et al. (1974) encontraron valores medios de 40 a 52mg/ml. Por su parte Roberts et al. (1975) aunque no observaron variaciones en la concentración de proteínas en las diferentes etapas del ciclo estral, sí percibieron diferencias entre individuos, siendo el valor medio de 32'2mg/ml, en una vaca, mientras que en otra fue de sólo 3'1mg/ml. En nuestro estudio, la concentración de proteínas en el FOB en las dos fases del ciclo estral, no presenta variaciones significativas a lo largo del ciclo y tiene un valor medio de 55'08mg/ml (Tabla 15). Estos resultados coinciden con los presentados por Carlson et al. (1970), Stanke et al. (1974) y Roberts et al. (1975) que no hallaron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre las distintas fases del ciclo estral. Igualmente, en nuestro trabajo los valores calculados para las proteínas totales son similares en las dos fases del ciclo estral (1'94mg/oviducto y 2'07mg/oviducto) para las fases folicular y la luteal, respectivamente).

En el FOP, según algunos estudios, la concentración de proteínas permanece sin cambios durante el ciclo estral, con un valor medio de 12mg/ml (Iritani et al., 1974), empero, Buhi et al. (1998) encontraron que la cantidad total de proteínas en el cerdo durante el estro es significativamente más alta antes, durante y poco después de la ovulación y durante la fecundación que en cualquiera de los otros días, lo que indica que

hay una variación cíclica con concentraciones más altas en los momentos de predominancia estrogénica.

Estos datos se confirman en nuestro estudio, donde la cantidad de proteínas totales por oviducto en el FOP en los momentos previos a la ovulación es de 2'11mg/oviducto, valor éste mayor que el obtenido para las otras etapas del ciclo estral. Estos resultados concuerdan con los conseguidos para la especie porcina (Buhi et al., 1989) y equina donde las proteínas totales disminuyeron significativamente desde el estro (53'9mg/24hr) a las demás etapas del ciclo (24'6mg/24hr; Willis et al., 1994). Con este resultado se podría especular que las proteínas totales en el FOP aumentan en los momentos cercanos a la ovulación como consecuencia de la síntesis y secreción de las glicoproteínas específicas del oviducto que, posteriormente, podrían favorecer la fecundación al unirse al ovocito para modificar la estructura de la ZP.

En cuanto al volumen de FO secretado, varios estudios han hallado un incremento al inicio del estro seguido de un descenso a medida que el ciclo progresa en porcinos (Engle et al., 1968), equinos (Engle et al., 1970) y ovinos (Perkins y Gooden, 1966; Belvé y McDonald, 1968). En bovinos, Kavanaugh y Killian (1988) en un estudio efectuado en vacas canuladas determinaron que los volúmenes de fluido oviductal recogido para todo el oviducto oscilaron entre 0'1 y 3'0ml/día dependiendo de la etapa del ciclo estral. Además, en vacas y conejas se ha encontrado que la actividad secretora de la ampolla oviductal es más intensa que la del istmo debido a la mayor proporción de células secretoras en esta región oviductal. David et al. (1969) encontraron que la ampolla produce aproximadamente dos tercios del total de la secreción diaria, mientras que el istmo aporta el resto. Entre tanto, Kavanaugh et al., (1992) hallaron que durante el estro el FOB recogido diariamente de la ampolla tiene una media de 1'04ml y en el istmo de 0'50ml, disminuyendo a la mitad durante la fase luteal. Igualmente, en un trabajo realizado también en vacas canuladas se determinó que el volumen de FOB de todo el oviducto se produce en una proporción diaria de 0'2ml durante el diestro y de 2'0ml al momento del estro (Roberts et al., 1975). Los resultados de nuestro estudio indican que el volumen de FOB obtenido de todo el oviducto durante las dos fases del ciclo estral no varía (Tabla 15), lo cual está en desacuerdo con los trabajos mencionados anteriormente, posiblemente porque nuestro estudio se efectuó en oviductos obtenidos de matadero y teniendo en cuenta sólo las dos fases del ciclo estral, en tanto que los trabajos mencionados se realizaron en animales vivos y tomando muestras en las 4 etapas del ciclo estral (folicular temprana y tardía; y luteal temprana y tardía).

El volumen de FOP obtenido durante el estro por Engle et al. (1968) fue de 2'7ml, empero la cantidad de FOP secretado durante la fase postovulatoria se desconoce. Entretanto, el promedio de FOP obtenido por Archibong et al. (1989) durante los primeros 4 días del ciclo estral fue de 6'2ml, cuando los 2 oviductos fueron canulados y ligados en la unión útero-tubárica, aunque no se indica el volumen secretado por cada oviducto ni la cantidad de FO producido en los otros días del ciclo estral. Estos datos tan elevados podrían estar alterados por las lesiones edematosas que se producen en oviductos canulados donde se ha ligado la unión útero-tubárica (Kavanaugh, et al., 1992), ya que Wiseman et al. (1992) encontraron que el volumen de FOP secretado por un oviducto, no ligado pero canulado, fue de 1'2ml durante el estro y disminuyó aproximadamente a la mitad durante las siguientes fases del ciclo estral. Igualmente, el volumen diario de FOP obtenido por Iritani et al. (1974) a partir de 5 hembras canuladas durante el estro fue 5'1ml, valor significativamente más alto que el obtenido durante el diestro (2'1ml). En este trabajo el volumen de FOP obtenido mostró variaciones a lo largo del ciclo, presentándose el mayor volumen en el momento cercano a la ovulación (fase folicular tardía) con algo más de 50µl/oviducto y luego descendió de forma progresiva a medida que el ciclo avanzó, coincidiendo con las investigaciones realizadas por los autores arriba mencionados, y con un estudio realizado por Perkins, (1974) donde encontró que los estrógenos, predominantemente, estimulan las secreciones de FO mientras que la progesterona las inhibe. Igualmente, estos resultados coinciden con los de otras especies, como los realizados en FO equino por Willis et al. (1994). Esto indica que el método de aspiración para obtener FO de forma puntual en animales sacrificados en matadero puede ser tan efectivo como las técnicas de obtención de FO *in vivo*. Desde el punto de vista cuantitativo, debe tenerse en cuenta que si bien es cierto que los valores son más bajos mediante aspiración, también lo es que mediante esta técnica el FO se puede extraer sólo una vez, mientras que los métodos *in vivo*, como la canulación, la recogida es continua y la secreción podría verse falsamente aumentada tanto por el edema producido en el tejido por la inserción de la cánula, como por el incremento de la secreción del tejido por la falta del fluido mismo.