*Nota Científica***Monosacáridos terminales presentes en las cubiertas ovocitarias del camarón de roca *Rhynchocinetes typus* (Crustacea, Decapoda)**

Daniel Gómez y Enrique Dupré
Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar
Universidad Católica del Norte, Casilla 117, Coquimbo, Chile
E-mail: edupre@ucn.cl

Recibido: 27 marzo 2002; versión corregida: 12 septiembre 2002; aceptado: 26 septiembre 2002

RESUMEN. Durante la primera interacción gamética, los oligosacáridos de las glicoproteínas presentes en las cubiertas ovocitarias son importantes en el reconocimiento del espermatozoide. Estos oligosacáridos presentan monosacáridos terminales que pueden ser reconocidos mediante lectinas específicas. En otras especies marinas no sólo se ha determinado la presencia de monosacáridos en las cubiertas ovocitarias sino que su número y ubicación varía durante la maduración del ovocito. El presente estudio determina la presencia de monosacáridos en las cubiertas ovocitarias y su ubicación durante la maduración del ovocito en el camarón de roca, mediante el uso de las siguientes lectinas específicas conjugadas con FITC: LCA, BS-1, LTA y Con-A, las cuales reconocen los monosacáridos manosa, galactosa, fucosa y glucosa respectivamente. Los resultados mostraron que manosa está presente en cantidades 2-3 veces mayores que los otros azúcares y que manosa, galactosa y glucosa se incrementan desde los 5 días premuda hasta los 2 días postmuda sin ser estadísticamente significativas. La fucosa presentó la menor concentración. Estos resultados sugieren que estos azúcares podrían participar en la primera interacción gamética, sin embargo, la participación en la fecundación debe ser determinada a través de ensayos de inhibición de la fecundación *in vitro* con espermatozoides previamente tratados con estos azúcares a fin de bloquear los sitios que interactúan con las cubiertas de los ovocitos.

Palabras claves: carbohidratos, cubierta vitelina, corion, ovocito, camarón.

**Terminal monosaccharid on the oocyte envelope of the shrimp rock
Rhynchocinetes typus (Crustacea, Decapoda)**

ABSTRACT. Oligosaccharids of glycoproteins present in oocytes envelope during the first gamete interaction have an important role in the sperm recognizing process. The terminal monosaccharid of oligosaccharids can be recognized by specific lectins. The number and location of monosaccharid on the oocyte coat changes in many marine species according to the oocyte maturation. This study determines the presence of monosaccharids on the oocyte envelope and its location during the oocyte maturation by the following specific FITC-labeled lectins: LCA, BS-1, LTA and Con-A which recognize the mannose, galactose, fucose and glucose monosaccharid respectively. The results of the lectins experiments showed a high concentration of mannose (2-3 time) on the mature oocyte coat. From 5 days pre-molt to 2 day post-molt the concentration of mannose, galactose and glucose increasing on the oocyte envelope increased. The fucose monosaccharide was 3 time less than mannose. This results suggest that mannose could be participating in the first gametic interaction., however the involvement of these carbohydrates during the fertilization must be determined by in vitro fertilization inhibition experiments.

Key words: carbohydrates, vitelline coat, chorion, oocyte, shrimp.

Los ovocitos están rodeados por material extracelular llamados envolturas o cubiertas ovocitarias. Estas envolturas median las interacciones que ocurren entre el ovocito y el espermatozoide; desencadenan la reacción acrosómica en el espermatozoide, brindan protección al ovocito y posteriormente al embrión contra daños químicos o mecánicos que pudieran sufrir (Wikramanayake y Clark, 1994; Tian *et al.*, 1997; Vacquier, 1998). La más importante de estas funciones es el reconocimiento entre gametos, la cual se genera gracias a los receptores moleculares que éstas poseen (Wassarman, 1987; O'Rand, 1988; Vacquier, 1998).

El reconocimiento entre los gametos está regulado por moléculas receptoras ubicadas en el ovocito y en el espermatozoide de todos los animales que se reproducen vía fusión de gametos (Glabe *et al.*, 1982; Barros *et al.*, 1986; Ruiz-Bravo y Lennarz 1989; Focarelli *et al.*, 1990; Litscher y Honegger, 1991; Ríos, 1993; Wikramanayake y Clark, 1994; Correa y Carroll, 1997; Tian *et al.*, 1997). Estas moléculas son glicoproteínas (Glabe *et al.*, 1982; Ruiz-Bravo y Lennarz, 1989; Focarelli *et al.*, 1990; Xie y Honegger, 1993; Wikramanayake y Clark, 1994), que presentan oligosacáridos terminales en su cara externa siendo estas últimas las responsables del reconocimiento espermático y la cadena polipeptídica la responsable de la función de especificidad (Monroy y Rosati, 1983; Wassarman, 1987; Ruiz-Bravo y Lennarz, 1989; Litscher y Honegger, 1991).

En erizos de mar, la adhesión especie-específica del espermatozoide a la cubierta vitelina se debería a la proteína llamada bindina ubicada en el espermatozoide y que reconoce un glicopéptido de 350 kDa que se encuentra en la cubierta vitelina de los ovocitos de los erizos (Monroy y Rosati, 1983; Wassarman, 1987; Correa y Carroll, 1997; Hirohashi y Lennarz, 2001). En tunicados la adhesión del espermatozoide a la cubierta vitelina está mediada por un complejo enzima-sustrato establecido entre una glicosidasa de la superficie del espermatozoide y su complementaria azúcar en la cubierta vitelina (Litscher y Honegger, 1991). Específicamente, en *Ascidia nigra* y *Phallusia mammillata* se revelaron residuos de N-acetilglucosamina en la cubierta vitelina y N-acetilglucosaminidasa en la membrana del espermatozoide (Xie y Honegger, 1993), mientras que en *Ciona intestinalis* y en el bivalvo *Unio elongatulus* los residuos fucosil de la cubierta vitelina son los encargados de adherir al espermato-

zoide (Rosati y De Santis, 1980; Pinto *et al.*, 1981; Focarelli *et al.* 1990).

En crustáceos, estudios efectuados en el peneido *Sicyonia ingentis* (Pillai y Clark, 1990; Glas *et al.*, 1996) señalan la existencia de un cambio en las cubiertas post-desove debido a la exocitosis de vesículas semejantes a gránulos corticales que reorganizan las envolturas ovocitarias formando una cubierta o envoltura de incubación, la cual contiene residuos azucarados como: manosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico (Pillai y Clark, 1990). En *Rhynchocinetes typus*, se determinó que el proceso acicular espermático que interactúa inicialmente con la cubierta del ovocito (Dupré, 1991) ejerce un efecto lítico sobre ésta y así penetra a través de ella, sin embargo Palomino (2000) demostró que el porcentaje de fecundaciones *in vitro* disminuye significativamente cuando se preincuban espermatozoides con cubiertas solubilizadas, sugiriendo que existirían moléculas de las cubiertas que participarían en la fecundación.

Toda la evidencia existente en organismos marinos demuestra que en la primera interacción gamética participan azúcares ligados a proteínas. En el presente estudio se analizó la presencia de residuos oligosacáridos y su ubicación durante la maduración del ovocito. Para esto se determinó la presencia de monosacáridos en cubiertas ovocitarias intactas (CI) y aisladas (CA), mediante el uso de las siguientes lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (10 mg/mL) disueltas en PBS+BSA 3 mg/mL: *Bandeiraea simplicifolia*-1 (BS-1), *Lens culinaris* (LCA), *Lotus tetranoglobus* (LTA) y Concanavalina-A (Con-A), que reconocen galactosa, manosa, fucosa y glucosa respectivamente.

Las cubiertas se aislaron de ovocitos frescos en distintos tiempos de madurez (5 días, 1-2 día premuda y 2 días postmuda) y se colocaron en cápsulas de Petri conteniendo agua de mar artificial sin calcio (AMA s/Ca²⁺) con EDTA (NaCl 0,4 M; KCl 9 mM; MgCl₂ 23 mM; MgSO₄ 25 mM; NaHCO₃ 2 mM; + EDTA 10 mM), durante 15 a 30 minutos y con una micropipeta se recogieron las cubiertas desprendidas (Ríos y Barros, 1997). Las cubiertas se lavaron con AMA s/Ca²⁺ + EDTA para eliminar las plaquetas de vitelo adheridas y luego se fijaron en formalina 4% por 1 hora. Posteriormente, se incubaron por 20 min con cada una de las lectinas y se cuantificó la fluorescencia bajo un microscopio de fluorescencia con un fotómetro previamente calibra-

do para las ovocitos totales y cubiertas aisladas. Como control se utilizaron cubiertas incubadas con 100 ml de PBS en reemplazo de las lectinas.

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis ANOVA de una vía. Los porcentajes de luminosidad obtenidos, permiten comparar la cantidad en que se encuentra cada uno de los monosacáridos reconocidos por las respectivas lectinas en los distintos tiempos de madurez. Según este criterio, manosa fue el monosacárido que se encontró en mayor cantidad en todos los tiempos de madurez evaluados, incrementando su concentración a medida que madura el ovocito (Fig. 1), ya que para los tratamientos con LCA, en todos los estados de maduración, tanto para las cubiertas aisladas como las sin aislar, los valores de fluorescencia fueron 2-3 veces mayores que para las otras lectinas.

Aun cuando la fluorescencia obtenida con BS-1, que identifica galactosa, fue dos veces menor que LCA, se observó un incremento de la fluorescencia, tanto en cubiertas aisladas como sin aislar, entre los estados premuda y postmuda (Fig. 2). Este mismo incremento se observó en cubiertas aisladas tratadas con Con-A (identifica glucosa) pero con valores 4 veces inferiores a manosa (LCA). Los menores valores se obtuvieron en los tratamientos con

LTA mostrando que la fucosa se encontró en menor cantidad, siendo similares (12,2%) para los tres estados de madurez (Fig. 2).

Estudios realizados en cubiertas ovocitarias del camarón *Sicyonia ingentis* (Pillai y Clark, 1990; Glas *et al.*, 1996), del erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (Correa y Carroll 1997) y de bovinos (Amari *et al.*, 2001), demostraron que las cubiertas ovocitarias se encuentran altamente manosiladas, es decir, poseen altas cantidades de manosa al igual que el corion de *R. typus*, lo cual podría atribuirse a una eventual participación de este azúcar en la primera interacción gamética. Esta sugerencia es respaldada por los altos porcentajes de inhibición de la fecundación obtenidos en ensayos preliminares, al preincubar los espermatozoides con manosa (la inhibición de la fecundación sólo ocurrió utilizando manosa en concentraciones de 500 mM) y posteriormente inseminarlos con ovocitos maduros.

La alta presencia de algunos carbohidratos en las cubiertas ovocitarias se ha relacionado con la intervención de dichos azúcares en la primera interacción gamética (Honegger, 1982; Litscher y Honegger, 1991). Por ejemplo en *Phallusia mammillata*, se demostró que N-acetilglucosamina que está implicada en la primera interacción

Figura 1. Cubiertas aisladas de ovocitos de *R. typus* tratadas con las lectinas LCA (para manosa); BS-I (para galactosa); Con-A (para glucosa) y LTA (para fucosa) en diferentes estados de maduración.

Figure 1. Isolated oocyte coat of *R. typus* treated with different lectins (LCA for mannose; BS-I for galactose; Con-A for glucose and LTA for fucose) at different maturation stages.

Figura 2. Porcentaje de fluorescencia de cubiertas ovocitarias de *R. typus* tratadas con diferentes lectinas (LCA para manosa; BS-I para galactosa; Con-A para glucosa y LTA para fucosa) en diferentes estados de maduración.

Figure 2. Fluorescence percentage of oocytes coat of *R. typus* treated with different lectins (LCA for mannose; BS-I for galactose; Con-A for glucose and LTA for fucose) at different maturation time.

gamética es uno de los azúcares que se encuentran en mayor cantidad en las cubiertas ovocitarias junto a N-acetil-galactosamina (Litscher y Honegger, 1991). Esto fue corroborado por Honegger (1982) mediante inhibición de la fecundación con la lectina WGA, la cual se adhiere específicamente a N-acetilglucosamina, bloqueando los sitios de unión espermática.

Por otra parte, el incremento en la concentración de la manosa durante la maduración del ovocito de *R. typus* podría indicar que los receptores que intervienen en la primera interacción gamética estarían aumentando alrededor de todo el corion, para aumentar la probabilidad de que el espermatozoide se una a la cubierta para tomar parte en la fecundación. Esto mismo se determinó en el bivalvo de agua dulce *Unio elongatulus* donde sus ovocitos se especializan de manera notable para la fecundación (Focarelli *et al.* 1990) a medida que ocurre la maduración concentrando en el polo vegetativo de la cubierta vitelina moléculas de fucosa que están directamente involucradas en la primera interacción gamética. El monosacárido fucosa, pasa de estar en toda la cubierta vitelina a restringirse sólo en esta región (Focarelli *et al.*, 1990), formando parte de las cadenas de oligosacáridos de una glicoproteína de 220 kDa. Este complejo molecular es el encargado del reconocimiento y adhesión del espermato-

zoide (Focarelli *et al.* 1990; Focarelli y Rosati 1995; Capone *et al.*, 1999). Aunque la especialización en el corion de *R. typus* sería tan marcada, sí existe evidencia de un aumento en la concentración de manosa, implicada en la fecundación.

Estos antecedentes permiten sugerir que la manosa estaría implicada en la primera interacción espermatozoide-ovocito, no así los otros azúcares galactosa, glucosa y fucosa.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado a través de proyecto (DGICT –UCN 2001-2002) de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Católica del Norte.

REFERENCIAS

- Amari, S., N. Yonezawa, S. Mitsui, T. Katsumata, S. Hamano, M. Kuwayama, Y. Hashimoto, A. Suzuki, Y. Takeda y M. Nakano. 2001. Essential role of the nonreducing terminal α -mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Dev.*, 59(2): 221-226.

- Barros, C., E. Dupré y L. Viveros. 1986.** Sperm-egg interactions in the shrimp *Rhynchocinetes typus*. Gamete Res., 14: 171-180.
- Capone, A., F. Rosati y R. Focarelli. 1999.** A 140-kDa glycopeptide from the sperm ligand of the vitelline coat of the freshwater bivalve *Unio elongatulus*, only contains O-linked oligosaccharide chains and mediates sperm-egg interaction. Mol. Reprod. Dev., 54(2): 203-207.
- Correa, L.M. y E.J. Carrol Jr. 1997.** Characterization of the vitelline envelope of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Develop. Growth Differ., 39: 69-85.
- Dupré, E. 1991.** Interacciones gaméticas en *Rhynchocinetes typus* (Crustacea, Decapoda, Natantia): Destino de las estructuras espermáticas y formación del pronúcleo macho. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile, 53 pp.
- Focarelli, R y F. Rosati. 1995.** The 220-kDa vitelline coat glycoprotein mediates sperm binding in the polarized egg of *Unio elongatulus* through O-linked oligosaccharides. Develop. Biol., 171(2): 606-614.
- Focarelli, R., D. Rosa y F. Rosati. 1990.** Differentiation of the vitelline coat and the polarized site sperm entrance in the egg of *Unio elongatulus* (Mollusca, Bivalvia). J. Exp. Zool., 254: 88-96.
- Glabe, Ch., L.B. Grabel, V.D. Vacquier y S.D. Rosen. 1982.** Carbohydrate specificity of sea urchin bindin: a cell surface lectin mediating sperm-egg adhesion. J. Cell Biol., 94: 123-128.
- Glas, P. S., J.D. Green y J.W. Lynn. 1996.** Morphological evidence for a chitin-like glycoprotein in penaeid hatching envelopes. Biol. Bull., 191(3): 374-384.
- Hirohashi, N. y W.J. Lennarz. 2001.** Role of a vitelline layer-associated 350 kDa glycoprotein in controlling species-specific gamete interaction in the sea urchin. Develop. Growth Differ., 43(3): 247-255.
- Honegger, T.G. 1982.** Effect on fertilization and localized binding of lectins in the ascidian *Phallusia mammillata*. Exp. Cell Res., 138: 446-451.
- Litscher, E. y T.G. Honegger. 1991.** Glycoprotein constituents of the vitelline coat of *Phallusia mammillata* (Ascidacea) with fertilization inhibiting activity. Develop. Biol., 148: 536-551.
- Monroy, A. y F. Rosati. 1983.** Review article: a comparative analysis of sperm-egg interaction. Gamete Res., 7: 85-102.
- O'Rand, M.G. 1988.** Sperm-egg recognition and barriers to interspecies fertilization. Gamete Res., 19: 315-328.
- Palomino, J. 2000.** Participación de moléculas de las cubiertas ovocitarias del camarón de roca *Rhynchocinetes typus* (Milne-Edwards, 1836) en la fecundación. Tesis de Biología Marina. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 55 pp.
- Pillai, M.C. y W. Clark Jr. 1990.** Development of cortical vesicles in *Sicyonia ingenti* ova: their heterogeneity and role in elaboration in the hatching envelope. Mol. Reprod. Dev., 26: 78-89.
- Pinto, M.R., R. De Santis, G.D'Alessio y F. Rosati. 1981.** Studies on fertilization in the ascidians. Fucosyl sites on vitelline coat of *Ciona intestinalis*. Exp. Cell Res., 132: 289-295.
- Ríos, M. 1993.** Participación de enzimas del espermatozoide de *Rhynchocinetes typus* en la fecundación. Tesis de Magister en Ciencias. Universidad de Chile, 52 pp.
- Ríos, M. y C. Barros. 1997.** Trypsin-like enzymes during fertilization in the shrimp *Rhynchocinetes typus*. Mol. Reprod. Dev., 46: 581-586.
- Rosati, F. y R. De Santis. 1980.** Role of the surface carbohydrates in sperm-egg interaction in *Ciona intestinalis*. Nature, 283: 762-764.
- Ruiz-Bravo, N. y W.J. Lennarz. 1989.** Receptors and membrane interactions during fertilization. En: H. Schatten y G. Schatten (eds.). The molecular biology of fertilization. Academic Press Inc. London, New York, pp. 21-36.
- Tian, J., D. Gong, G.D. Tbomsen y W.J. Lennarz. 1997.** Gamete interactions in *Xenopus laevis*: identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. J. Cell Biol., 136(5): 1099-1108.
- Vacquier, V.D. 1998.** Evolution of gamete recognition proteins. Science, 281: 1995-1998.

- Wassarman, P.M. 1987.** The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 235: 553-560.
- Wikramanayake, A.D. y W. Clark Jr. 1994.** Two extracellular matrices from oocyte of the marine shrimp *Sicyonia ingentis* that independently mediate only primary or secondary sperm binding. *Develop. Growth Differ.*, 36(1): 89-101.
- Xie, M. y T.G. Honegger. 1993.** Ultrastructural investigations on sperm penetration and gamete fusion in the ascidians *Boltenia villosa* and *Phallusia mammillata*. *Mar. Biol.*, 116: 117-127.