

## ÍNDICE

	Página
<b>0. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>2</b>
0.1. <u>OBJETIVOS</u> .....	7
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
1.1. <u>INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO</u> .....	9
1.1.1. Preliminares .....	9
1.1.1.1. Capacitación e hiperactivación .....	9
1.1.1.2. Interacción espermatozoide-células del <i>cumulus</i> .....	12
1.1.2. Interacción con la zona pelúcida (ZP) .....	14
1.1.2.1. Estructura y composición de la ZP .....	14
1.1.2.2. Funciones de la ZP .....	18
1.1.2.3. Modelos de unión espermatozoide-ZP .....	20
1.1.2.4. Especificidad de especie en la unión a ZP .....	22
1.1.2.5. Receptores del espermatozoide y la ZP .....	24
1.1.3. Reacción acrosómica (RA).....	25
1.1.3.1. Regulación del calcio intracelular durante la RA.. .....	26
1.1.3.2. Fusión de membranas y exocitosis .....	29
1.1.4. Interacción con la membrana plasmática (oolema) .....	30
1.1.4.1. Métodos de estudio de los mecanismos de interacción .....	34
1.1.4.2. Moléculas implicadas en el proceso de unión y adhesión entre el espermatozoide y el ovocito .....	36
1.1.4.3. Moléculas implicadas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito .....	37
1.1.5. Interacción con el citoplasma .....	40

1.2.	<u>MODIFICACIONES EN LA ZONA PELÚCIDA QUE AFECTAN A LA INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE OVOCITO HOMÓLOGA</u> .....	42
1.2.1.	Polispermia .....	42
1.2.2.	Bloqueo de la polispermia .....	43
1.2.3.	Mecanismos implicados en el bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP .....	46
1.2.4.	Efecto de las células y secreciones oviductales .....	49
1.2.5.	El problema de la polispermia en las especies porcina y bovina .....	51
1.3.	<u>INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HETERÓLOGA COMO MODELO PARA EL DESARROLLO DE PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA</u> .....	53
1.3.1.	Antecedentes y situación actual .....	53
1.3.2.	Estudio de las características físicas y bioquímicas del semen .....	55
1.3.3.	Estudio de las características funcionales del semen .....	56
1.3.3.1.	Pruebas bioquímicas para analizar la funcionalidad espermática .....	56
1.3.3.2.	Bioensayos de interacción de gametos .....	60
1.3.3.2.1.	Ensayo de penetración del moco cervical .....	60
1.3.3.2.2.	Evaluación de la reacción acrosómica .....	61
1.3.3.2.3.	Ensayos de interacción o unión a ZP .....	67
1.3.3.2.4.	Ensayos de penetración de espermatozoides en ovocitos libres de ZP .....	69
1.3.3.2.5.	ICSI heteróloga .....	71
1.3.3.2.6.	FIV homóloga y heteróloga .....	73

<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
2.1. <u>OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....</u>	76
2.1.1. Obtención de espermatozoides .....	76
2.1.1.1. Espermatozoides porcinos .....	76
2.1.1.2. Espermatozoides bovinos .....	76
2.1.1.3. Espermatozoides humanos .....	77
2.1.2. Obtención de ovocitos .....	77
2.1.2.1. Ovocitos bovinos inmaduros .....	77
2.1.2.2. Ovocitos porcinos inmaduros .....	78
2.1.2.3. Ovocitos ovulados (oviductales) .....	79
2.1.2.4. Ovocitos madurados <i>in vivo</i> (foliculares) .....	81
2.1.3. Obtención de fluido oviductal .....	81
2.2. <u>MEDIOS DE TRANSPORTE, LAVADO Y RECOGIDA DE LOS GAMETOS .....</u>	83
2.2.1. Medio de transporte de los ovarios .....	83
2.2.2. Medio de lavado de los ovarios .....	83
2.2.3. Medio de recogida de ovocitos de vaca .....	83
2.2.4. Medio de recogida de ovocitos de cerda .....	84
2.2.5. Medios de dilución de dosis seminales .....	84
2.3. <u>MEDIOS DE CULTIVO (MADURACIÓN FECUNDACIÓN IN VITRO) .....</u>	85
2.3.1. Medios de Maduración in vitro (MIV) de ovocitos .....	85
2.3.2. Medios de Fecundación in vitro (FIV) .....	88
2.3.3. Medios de manipulación y capacitación de espermatozoides .....	91

	Página
2.4. <u>PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES</u> .....	94
2.4.1.      Procesado de espermatozoides porcinos .....	94
2.4.2.      Procesado de espermatozoides bovinos .....	94
2.4.3.      Procesado de espermatozoides humanos .....	95
2.5. <u>INDUCCIÓN Y VALORACIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA (R.A.)</u> .....	95
2.5.1.      Inducción de RA con ionóforo de calcio .....	95
2.5.2.      Inducción de RA con agonistas naturales .....	96
2.5.3.      Valoración de la reacción acrosómica .....	96
2.6. <u>MADURACIÓN IN VITRO (MIV) DE OVOCITOS</u> .....	99
2.6.1.      Maduración in vitro de ovocitos bovinos .....	99
2.6.2.      Maduración in vitro de ovocitos porcinos .....	99
2.6.3.      Preincubación de ovocitos porcinos y bovinos en DTSP .....	99
2.6.4.      Preincubación de ovocitos porcinos y bovinos en fluido oviductal .....	100
2.7. <u>DIGESTIÓN DE LA ZP CON PRONASA</u> .....	100
2.7.1.      Tiempo de digestión de la ZP .....	101
2.7.2.      Obtención de ovocitos libres de ZP .....	101
2.8. <u>FECUNDACIÓN IN VITRO</u> .....	103
2.8.1.      Fecundación in vitro homóloga (porcina y bovina) .....	103
2.8.2.      Fecundación in vitro homóloga y heteróloga con ovocitos libres de ZP .....	103
2.8.3.      Fecundación in vitro heteróloga con ovocitos completos .....	104
2.8.4.      Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	104

	Página
2.8.5. Valoración de resultados .....	106
2.9. <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u> .....	109
2.9.1. Bloque I: Modificaciones en la zona pelúcida que afectan a la interacción espermatozoide ovocito homóloga.....	109
2.9.1.1. Endurecimiento de la ZP porcina y bovina con agentes químicos .....	109
2.9.1.1.1. Efecto del DTSP sobre la resistencia de la ZP a la digestión con proteasa y sobre los resultados de FIV en la especie porcina .....	109
Experimento 1 .....	109
Experimento 2 .....	109
Experimento 3 .....	110
2.9.1.1.2. Efecto del DTSP sobre la resistencia de la ZP a la digestión con proteasa y sobre los resultados de FIV en la especie bovina .....	110
Experimento 4 .....	110
Experimento 5 .....	110
2.9.1.2. Endurecimiento de la ZP porcina y bovina con agentes biológicos .....	111
2.9.1.2.1. Efecto del fluido oviductal sobre la resistencia a la digestión con proteasa y sobre los resultados de FIV en la especie porcina ... ..	111
Experimento 6 .....	111
Experimento 7 .....	111
Experimento 8 .....	112
2.9.1.2.2. Efecto del fluido oviductal sobre la resistencia a la digestión con proteasa en la especie bovina .....	112
Experimento 9 .....	112

	Página
Experimento 10 .....	113
2.9.2. Bloque II: Interacción espermatozoide-ovocito heteróloga: Diseño de un modelo para el desarrollo de un test de funcionalidad espermática .....	113
2.9.2.1. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la ZP .....	113
Experimento 11 .....	113
Experimento 12 .....	114
2.9.2.2. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la membrana plasmática .....	114
Experimento 13 .....	114
2.9.2.3. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel del citoplasma .....	115
Experimento 14 .....	115
2.10. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u> .....	117
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>119</b>
3.1 <u>EFEECTO DEL DTSP SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN CON PRONASA Y SOBRE LOS RESULTADOS DE FIV EN LA ESPECIE PORCINA</u> .....	119
3.1.1. Experimento 1 .....	119
3.1.2. Experimento 2 .....	120
3.1.3. Experimento 3 .....	121

3.2.	<u>EFECTO DEL DTSP SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTION CON PRONASA Y SOBRE LOS RESULTADOS DE FIV EN LA ESPECIE BOVINA</u> .....	123
3.2.1.	Experimento 4 .....	123
3.2.2.	Experimento 5 .....	123
3.3.	<u>EFECTO DEL FLUIDO OVIDUCTAL SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN CON PROTEASA Y SOBRE LOS RESULTADOS DE FIV EN LA ESPECIE PORCINA</u> .....	124
3.3.1.	Experimento 6 .....	124
3.3.2.	Experimento 7 .....	126
3.3.3.	Experimento 8 .....	127
3.4.	<u>EFECTO DEL FLUIDO OVIDUCTAL SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN CON PROTEASA EN LA ESPECIE BOVINA</u> .....	128
3.4.1.	Experimento 9 .....	128
3.4.2.	Experimento 10 .....	129
3.5.	<u>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA ZONA PELÚCIDA PORCINA PARA INDUCIR LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS</u> .....	131
3.5.1.	Experimento 11 .....	131
3.5.2.	Experimento 12 .....	132

	Página
3.6	<u>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PENETRACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN OVOCITOS PORCINOS SIN ZP</u> ..... 133
3.6.1	Experimento 13 ..... 133
3.7	<u>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS PARA FORMAR PRONÚCLEOS MASCULINOS TRAS SER INYECTADOS EN EL CITOPLASMA DE OVOCITOS PORCINOS</u> ..... 134
3.7.1	Experimento 14 ..... 134
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> ..... <b>138</b>
4.1.	<u>INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HOMÓLOGA</u> ..... 138
4.1.1.	El tratamiento de los ovocitos porcinos con el agente químico DTSP incrementa la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con proteasa, favorece la monospermia y aumenta el rendimiento de la fecundación in vitro ..... 141
4.1.2.	El tratamiento de los ovocitos bovinos con el agente químico DTSP incrementa la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con proteasa y favorece la monospermia, pero no aumenta el rendimiento de la fecundación in vitro ..... 143
4.1.3.	El tratamiento de los ovocitos porcinos con fluido oviductal incrementa de modo reversible la resistencia de la ZP a la digestión con proteasa, favorece la monospermia y aumenta el rendimiento de la fecundación in vitro ..... 145

	Página
4.1.4. El tratamiento de los ovocitos bovinos con fluido oviductal incrementa de modo parcialmente reversible la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con proteasa .....	151
4.2. <u>INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HETERÓLOGA</u> .....	153
4.2.1. Los espermatozoides humanos son capaces de adherirse a la zona pelúcida porcina y sufrir la reacción acrosómica .....	153
4.2.2. Los espermatozoides humanos son incapaces de atravesar a membrana plasmática de los ovocitos porcinos.....	157
4.2.3. Los espermatozoides humanos pueden descondensarse y formar un pronúcleo masculino cuando son inyectados en el citoplasma de ovocitos porcinos .....	159
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>163</b>
<b>6. RESUMEN .....</b>	<b>166</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>172</b>
<b>8. ABREVIATURAS .....</b>	<b>176</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>179</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>203</b>