

0. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fecundación es uno de los procesos biológicos descritos más fascinantes, y a la vez más complejos. Esta interacción entre células altamente especializadas proporciona un ejemplo único de muchos procesos celulares (adhesión celular específica, señales celulares, regulación de exocitosis, migración celular, fusión celular y regulación del ciclo celular) y convierte dos células totalmente diferenciadas en un cigoto totipotente capaz de formar todos los tipos celulares existentes en el organismo (Miller, 2002).

A pesar de la importancia del estudio la fecundación para controlar la reproducción humana, regular la producción animal y mejorar la conservación de especies en peligro de extinción, entre otros fines, los mecanismos y las bases moleculares implicadas en la interacción espermatozoide-ovocito permanecen sin ser conocidos por completo. Los mayores avances se han producido en el conocimiento de la fecundación en ratón, mientras que la especie humana y los animales domésticos han sido menos estudiados, con excepciones puntuales como el caso de la oveja "Dolly". El conocimiento de dichos mecanismos nos permitiría el desarrollo de nuevas pruebas para diagnosticar las causas de reducción de la fertilidad o terapias para el tratamiento de enfermedades específicas, mejoras en la calidad de los embriones producidos *in vitro* y nuevas alternativas de contracepción para regular la población humana o las plagas.

La fecundación es el resultado de numerosos procesos que comienzan con el transporte de gametos en el tracto reproductor y terminan con la formación de los pronúcleos y la singamia, para dejar paso al desarrollo embrionario. La interacción entre el espermatozoide y el ovocito se produce a tres niveles: la zona pelúcida (ZP), la membrana plasmática y el citoplasma.

El paso inicial en la interacción de gametos es la unión entre el espermatozoide y la ZP. Aunque dicha unión no es completamente específica de especie, presenta grandes restricciones (Moller y cols., 1990; Rankin y Dean,

2000; Hoodbhoy y cols. 2005). El espermatozoide se une a esta formidable barrera y sufre la RA para atravesarla (Yanagimachi, 1994). Numerosos estudios evidencian que la unión del espermatozoide a la ZP es un proceso mediado por carbohidratos (Nixon et al., 2001; Wassarman y Litscher, 2001; Wassarman et al., 2001), pero los oligosacáridos precisos a los que se une el espermatozoide permanecen bajo debate y pueden variar según la especie.

Cuando analizamos la **interacción espermatozoide-ovocito homóloga**, (entre gametos de la misma especie) en mamíferos como el cerdo o la vaca, observamos que la ZP aparece como la estructura implicada en la unión del espermatozoide e inducción de la reacción acrosómica. *In vivo* entre sus funciones está la de prevenir la polispermia mediante mecanismos que provocan el endurecimiento de la ZP, la proteólisis y la eliminación de receptores para la unión de espermatozoides (Iwamoto y cols., 1999; Lindsay y Hedrick, 2004). Este bloqueo se asocia con la reacción cortical, provocada por la exocitosis del contenido de los gránulos corticales del ovocito, que provoca modificaciones en la ZP. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de este bloqueo siguen siendo un tema sin esclarecer. En la especie porcina son frecuentes las fecundaciones polispérmicas en fecundación *in vitro* (FIV), con porcentajes que oscilan entre el 40 y el 60% de polispermia de forma frecuente cuando el porcentaje de penetración es próximo al 100% de los ovocitos (Funahashi y Romar, 2004; Chen y cols. 2006). Por otro lado, en la especie bovina, los porcentajes de polispermia en FIV son menores (10-25 %, Wang y cols., 1997; Coy y cols., 2005a), aunque también provocan una disminución del rendimiento final del proceso.

Hasta ahora se ha considerado que tras la penetración se produce la reacción cortical y liberación del contenido de los gránulos corticales, cuyo efecto sobre la zona provoca una serie de modificaciones, (“hardening” o endurecimiento, proteólisis y modificación de receptores) responsables del bloqueo de la polispermia. Por lo tanto, una inadecuada liberación de los gránulos corticales provocaría que los mecanismos de bloqueo de la polispermia no

actuaran eficazmente. Se ha demostrado que en los ovocitos fecundados *in vitro* no se produce el endurecimiento de la ZP tras la fecundación, cuando los ovocitos porcinos y bovinos han sido madurados *in vitro* (Coy et al., 2002; 2005a). Sin embargo, *in vivo* Wang et al., (1998) demostraron que la ZP de los ovocitos ovulados recogidos de oviducto presenta una mayor resistencia a la digestión con pronasa (permaneciendo inalterable tras 2 horas en la solución de pronasa), mientras que en los madurados *in vitro* la ZP era digerida en 2 minutos aproximadamente.

De este modo se evidencia que en función del origen de los ovocitos (madurados *in vitro* u ovulados) la ZP puede ser digerida con mayor o menor facilidad, lo cual es resultado del grado de endurecimiento de la misma. Este resultado hace plantearse si las condiciones a las que son expuestos los ovocitos madurados *in vivo* y ovulados, podría ser la causa del endurecimiento de la ZP observado en ovocitos ovulados, de forma previa a la fecundación.

En relación con las **interacciones espermatozoide-ovocito heterólogas** (entre gametos de diferentes especies), hay publicados numerosos artículos que cuestionan los dogmas clásicos aceptados por la comunidad científica, en relación a la estricta especificidad de especie de la unión entre espermatozoide y ovocito.

Bedford (1977) publicó que existía cierto grado de interacción entre especies heterólogas a nivel de la unión espermatozoide-ovocito. Sin embargo planteó que el espermatozoide humano, era un caso peculiar en el que aparentemente la unión respondía a una estricta especificidad de especie. Posteriormente, se han descrito diferentes casos de interacción heteróloga entre espermatozoides porcinos y equinos con ZP bovina (Sinowatz, 2003); espermatozoides humanos y ZP solubilizada de hámster (Lee y cols., 1987) o unión de espermatozoides humanos a la molécula Gp273, responsable de la interacción en moluscos bivalvos (Delle Monache y cols., 2003; Focarelli y cols., 2003). De este modo se demuestra que el espermatozoide humano tampoco responde a una estricta especificidad de especie en la unión a ZP. Algunos de los

casos de interacción heteróloga espermatozoide-ZP desencadenan la inducción de la RA, demostrando que no se trataba de una simple interacción mecánica.

Atendiendo a la ZP, Zhu y Naz (1999) demostraron que existe un alto grado de homología entre especies para la secuencia de aminoácidos de la ZP3. Esta proteína se considera responsable de la unión del espermatozoide en diferentes especies, entre ellas el ratón (Wassarman y cols., 2004). En el caso del cerdo y el hombre la homología a nivel de ZP3 se cifra en el 78,9 % (Zhu y Naz, 1999). Teniendo en cuenta esto se plantea como una opción interesante estudiar si es posible la unión del espermatozoide humano a la ZP porcina, lo cual sería de utilidad para el estudio de la funcionalidad espermática humana. El estudio de la interacción espermatoide-ZP entre gametos humanos, presenta limitaciones debido a la dificultad para obtener ZP humana. Por esta razón numerosos grupos de investigación han intentado obtener ZP humana recombinante utilizando células CHO (*cells hamster ovary*), habiéndose demostrado en algunos casos que la proteína recombinante obtenida es funcional (Brewis y cols. 1996; Bray y cols, 2002; Chakravarty y cols. 2005), mientras que en otros la proteína no posee la actividad biológica esperada (Rankin y cols., 1998; Martic y cols., 2004). Recientemente Ni y cols. (2006) han publicado los resultados obtenidos utilizando péptidos de ZP humana recombinante que inducen la RA. De cualquier modo su uso no se ha extendido a nivel clínico, por lo que sigue siendo de interés buscar nuevas alternativas al uso de la ZP humana.

Continuando con el estudio de la especificidad de especie, existen lagunas en el conocimiento de la fecundación heteróloga utilizando ovocitos libres de ZP. Si bien los ovocitos de hámster sin ZP pueden ser fecundados por espermatozoides de numerosas especies, entre ellas la humana (Yanagimachi, 1976), los mecanismos implicados en tal proceso no son totalmente conocidos. El test de hámster surgió en los años setenta para evaluar la capacidad de los espermatozoides de fusionarse al oolema y penetrar ovocitos sin ZP y ha sido ampliamente utilizado, sin embargo en la actualidad su uso es limitado en los laboratorios de andrología, ya que requiere disponer de un animalario con

hembras de hámster a las que hay que inducir la ovulación y sacrificar para obtener ovocitos.

Estas limitaciones no se dan si pretendemos utilizar para esta prueba diagnóstica ovocitos de animales domésticos, rutinariamente sacrificados como animales de abasto en mataderos. El sistema de obtención de ovocitos y maduración *in vitro* de ovocitos porcinos está perfectamente establecido, con unos resultados excelentes (Funahasi et al., 1997; Coy et al. 2005b). El uso de ovocitos porcinos madurados *in vitro* a los que se les elimina la ZP para estudiar la funcionalidad de espermatozoides humanos es una alternativa al test de hámster, cuyo uso es hoy día bastante reducido a nivel clínico por los inconvenientes que acarrea su uso.

Finalmente, y para completar el estudio de la interacción heteróloga entre el espermatozoide humano y el ovocito porcino, se investiga la capacidad del espermatozoide humano de descondensarse y formar pronúcleos en el ovocito porcino. La capacidad de los espermatozoides para alcanzar este estado es de vital importancia, por ser requisito indispensable para que se produzca la fusión de pronúcleos y formación del embrión, más aún cuando en la actualidad existen técnicas de reproducción asistida que introducen el espermatozoide directamente en el citoplasma, siendo ésta la única etapa por la que pasa el espermatozoide en su unión con el gameto femenino. Existe alguna referencia (Kim y cols., 1999) que indica que no existen demasiados requisitos en cuanto a especificidad de especie. En base a ello, sería importante determinar si los espermatozoides humanos microinyectados en ovocitos porcinos tienen capacidad de descondensarse y si esta capacidad se relaciona con su habilidad de hacerlo en ovocitos humanos. En tal caso sería útil como prueba de funcionalidad para muestras que se van a destinar a la técnica de microinyección espermática (ICSI). Además, la posibilidad de establecer un sistema en el que se produzca la descondensación del núcleo espermático y visualización de los cromosomas, permitiría realizar estudios cromosómicos de gran importancia genética.

0.1 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las consideraciones descritas, el **objetivo general** de este estudio consiste en profundizar en el conocimiento de las interacciones espermatozoide-ovocito entre gametos de la misma y de diferentes especies con la finalidad de mejorar el control de la fecundación, que se podría concretar en: i) mejoras en el rendimiento de la técnica de fecundación *in vitro* disminuyendo la polispermia presente en FIV en las especies bovina y porcina (**objetivo específico 1**); ii) desarrollo de nuevas pruebas de fertilidad que permitan evaluar la funcionalidad de espermatozoides humanos utilizando ovocitos procedentes de hembras de animales domésticas de abasto, en concreto cerdas (**objetivo específico 2**).

En el primer caso, utilizamos el modelo porcino y bovino para ampliar nuestro conocimiento sobre el papel de la ZP en el bloqueo de la polispermia, ya que este mecanismo no es completamente eficaz en los actuales sistemas de fecundación *in vitro* empleados para estas especies.

Para estudiar este proceso se planteó: a) corroborar si los ovocitos de cerda y de vaca ovulados *in vivo* presentan endurecimiento de la ZP (en contraposición a lo que ocurre en ratón) y compararlos con los ovocitos madurados *in vitro* (MIV), además de buscar sustancias o métodos que permitan provocar dicho endurecimiento en los ovocitos madurados *in vitro* y comprobar el efecto de las secreciones oviductales sobre la ZP de ovocitos madurados *in vitro* y b) estudiar si existe relación entre el grado de endurecimiento de la ZP y los resultados de fecundación en cuanto a polispermia.

En el segundo bloque, el objetivo consiste en estudiar las interacciones entre espermatozoide humano y ovocito porcino a nivel de la zona pelúcida, oolema y ooplasma con el fin de desarrollar en el futuro un test de funcionalidad espermática aplicable en los centros de reproducción asistida humana.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta revisión se pretende hacer un repaso a los mecanismos implicados en la interacción espermatozoide-ovocito conocidos hasta el momento, en diferentes especies de interés ganadero y en la especie humana. Dichos mecanismos son de vital importancia, por ser críticos en el proceso de la fecundación, y su trascendencia se hace palpable ya que de ellos depende el éxito de esta función.

Un mayor conocimiento de los procesos que ocurren a este nivel, y el estudio de las condiciones *in vivo*, podría redundar en una mejora de los resultados de fecundación *in vitro* en las especies porcina y bovina cuya situación actual, perspectivas y aplicaciones se revisarán a continuación. Además, las interacciones espermatozoide-ovocito son el fundamento de un gran número de ensayos de funcionalidad espermática utilizados en la especie humana y en especies animales, cuyos objetivos son predecir el éxito de la fecundación, de los cuales serán revisados aquellos más utilizados y de mayor importancia a nivel de reproducción asistida.

1.1. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO

1.1.1. Preliminares

1.1.1.1. Capacitación e hiperactivación

Los espermatozoides de mamífero son incapaces de fecundar el ovocito inmediatamente después de la eyaculación y requieren un periodo de incubación en el tracto reproductor femenino para adquirir la capacidad de fecundar. Durante ese tiempo, el espermatozoide sufre un complejo proceso denominado capacitación que fue descrito por primera vez, de forma independiente, por Austin (1951; 1952) y Chang (1951).

La capacitación es un proceso reversible, que comienza con la eliminación de factores unidos al espermatozoide procedentes del plasma seminal y se considera que acaba cuando el espermatozoide es capaz de responder al estímulo provocado por los ligandos de la ZP, desencadenando la RA.

Durante dicho proceso se producen cambios bioquímicos en la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994), que dan lugar a una remodelación de las moléculas de la superficie celular, la desestabilización de la membrana plasmática y la hiperactivación espermática, preparando al espermatozoide para que sufra la RA. Algunos de los cambios bioquímicos que se producen son: disminución del número de moléculas de colesterol presentes en la membrana plasmática, el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y AMPc, el aumento del pH intracelular, variaciones en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y modificación de los patrones de fosforilación de proteínas (Visconti y Kopf, 1998; Breitbart, 2002).

In vivo, este proceso culmina en el oviducto y su papel en la capacitación es obvio, pero aún está por conocer con detalle cómo influyen los diferentes segmentos del oviducto, ya que la mayoría de estudios sobre capacitación han sido hechos *in vitro* (Rodríguez-Martínez y cols., 2001; Hunter and Rodríguez-Martínez, 2004).

In vitro, la capacitación puede ser simulada incubando espermatozoides epididimarios o eyaculados en un medio definido, cuya composición exacta varía según las especies o utilizar fluido oviductal *in vitro* (Bergqvist y cols., 2006). De forma general, estos medios están compuestos de una solución salina tamponada que contiene concentraciones adecuadas de electrolitos, sustancias que aportan energía, Ca^{2+} , bicarbonato y una fuente de proteína que generalmente es albúmina sérica bovina (BSA), aunque la función de los componentes mencionados a nivel molecular durante la capacitación no es totalmente conocida (Fraser y cols., 1995; Visconti y cols., 1999; Fraser, 2006).

Durante la capacitación, uno de los procesos bioquímicos que se produce es la desestabilización de la membrana plasmática, lo que provoca un aumento de la fluidez de la misma. El colesterol de la membrana de los espermatozoides es el responsable de la estabilidad de la membrana, permitiendo una permeabilidad iónica de la misma e inserción y motilidad limitada de las proteínas. *In vitro*, la incubación de los espermatozoides en medios que contienen albúmina, que actúa como adsorbente de colesterol (Cross, 1998), o con fluido folicular u oviductal, favorece la pérdida de colesterol y la consiguiente capacitación (de Lamirande y cols., 1997). Algunos autores proponen que esta pérdida de colesterol es necesaria para la exposición de determinados antígenos o ligandos, que interactúan con moléculas de reconocimiento presentes en la ZP (Benoff y cols., 1993). Visconti y Kopf, (1998) señalan que la pérdida de colesterol está relacionada con las señales que resultan de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina.

Otro de los procesos bioquímicos descritos que ocurren durante la capacitación es la modificación de los patrones de fosforilación de proteínas, observándose sobre todo variaciones en la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina, que en el caso de la especie humana van desplazándose desde el flagelo hacia la región acrosómica (Naz y cols., 1991).

La capacitación, además, se asocia a cambios en los patrones de motilidad del espermatozoide, fenómeno que se denomina hiperactivación y consiste en un patrón de movimientos que se observan en el momento cercano a la fecundación, descrito por primera vez por Yanagimachi (1969). Se considera que la hiperactivación es crítica para la fecundación (Stauss y cols., 1995), porque permite al espermatozoide desprenderse de la pared del oviducto, nadar en el lumen del oviducto o penetrar las células del *cumulus oophorus* para alcanzar el ovocito. Este movimiento, aparece bajo diferentes condiciones físicas y varía según las especies, pero básicamente implica un aumento de la amplitud de batido de la cola y movimientos asimétricos (Yanagimachi, 1994). Presumiblemente, el inicio de la hiperactivación se debe a una señal que se

produce en el oviducto en un momento exacto, pero todavía no ha sido identificada. Sin embargo sí se sabe que el resultado final de esta señal consiste en la interacción de los iones Ca^{2+} con el axonema del flagelo, lo que provoca la hiperactivación (Cook y cols., 1994). A este nivel actúan las “CatSper1” que funcionan como canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y controlan la entrada de este ión a nivel del flagelo (Carlson y cols. 2003). Aunque la hiperactivación ocurre normalmente *in vitro* a la vez que el proceso de capacitación, determinados autores consideran que los mecanismos implicados no coinciden exactamente. De hecho, en ratón y hámster la hiperactivación puede ocurrir en ocasiones independientemente de la capacitación (DeMott y cols., 1995; Olds-Clarke, 1989).

1.1.1.2. Interacción espermatozoide-células del *cumulus oophorus*

El *cumulus oophorus* es una estructura que rodea a los ovocitos de mamíferos y está formado por un conjunto de células y una matriz extracelular que une las células entre sí. La matriz es rica en ácido hialurónico (Salustri y cols., 1992) y numerosas proteínas han sido identificadas como componentes de la misma, incluyendo el inter- α inhibidor de tripsina, un proteinglicano sulfato y la proteína PTX3 (Relucenti y cols. 2005).

El *cumulus oophorus* (CO) es atravesado por el espermatozoide, gracias a su motilidad y a la presencia de hialuronidasa y PH-20 (Meyers y Rosenberger, 1999). Recientemente Kim y cols. (2005) han descrito la presencia de una proteína, “Hyal5”, que también participa en la penetración de las células del CO. Para alcanzar el ovocito y durante la penetración del CO el espermatozoide contactará con las células que lo forman, las cuales son capaces de sintetizar progesterona, en cantidades que en el caso de la especie humana pueden superar $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (Osman y cols., 1989). Esta concentración se ha demostrado efectiva en ensayos *in vitro* para inducir la RA del espermatozoide, más aún cuando la matriz formada por las células del *cumulus* actúa como barrera que evita la difusión de la progesterona.

El papel que juega en la fecundación la progesterona sintetizada por estas células ha sido debatido, ya que si uno de los requisitos para que los espermatozoides mantengan su capacidad fecundante es que su acrosoma esté intacto, la inducción de la RA por la progesterona no favorecería el éxito de la fecundación. Sin embargo, se ha demostrado en diferentes especies (humana, Morales y cols., 1988; hámster, Myles y cols., 1987) la capacidad que tienen de unirse a la ZP espermatozoides con el acrosoma reaccionado.

Roldán y cols. (1994) demostraron que la progesterona actúa como inductor o “primer” a nivel de los receptores GABA, preparando al espermatozoide para su interacción con la ZP. Recientemente Harper y Publicover (2005) han demostrado que cuando el espermatozoide se expone a un gradiente de progesterona, situación similar a lo que ocurre fisiológicamente, se observa una respuesta novedosa; se produce un ligero aumento en la concentración intracelular de calcio, de modo que en muchas células las oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular se superponen. Las células que manifiestan este patrón no sufren la RA, pero en cambio muestran un patrón de actividad flagelar asociado con aumentos y descensos de la concentración de calcio. En base a estos resultados, los autores proponen que la RA y el batido del flagelo están regulados por almacenes de Ca^{2+} diferentes, con mecanismos independientes que responden frente a distintos agonistas, siendo la progesterona *in vivo* responsable de la activación de las oscilaciones de Ca^{2+} que regulan el batido flagelar y no de la RA.

A pesar de que la eliminación de las células del *cumulus oophorus* de los ovocitos reduce el éxito de la fecundación *in vitro* en la mayoría de mamíferos (Van Soom y cols., 2002), en condiciones no fisiológicas es frecuente la eliminación de dichas células. En determinadas ocasiones existen motivos que justifican su eliminación, como la estandarización de las condiciones en que se realiza la fecundación o el estudio de los mecanismos de interacción espermatozoide-ZP (Van Soom y cols., 2002).

1.1.2. Interacción con la ZP

Una vez atravesadas las células del *cumulus oophorus*, el espermatozoide interacciona con el ovocito. Este proceso de interacción se produce a tres niveles: la ZP, que induce la exocitosis del contenido acrosomal, la membrana plasmática del ovocito, con la que se fusiona, y finalmente el citoplasma, donde se produce la descondensación del espermatozoide (**Figura 1**).

1.1.2.1. Estructura y composición de la ZP

La ZP es una estructura porosa de composición glicoproteica, que está formada por un número variable, según la especie, de glicoproteínas denominadas de forma genérica ZP1, ZP2, ZP3 y en algunos casos ZP4, cuyas principales funciones son la unión del espermatozoide, prevención de la polispermia, protección del embrión hasta su implantación y el bloqueo de la fecundación heteroespecífica (Yanagimachi, 1994; Wassarman y Litscher, 2001; Rath y cols., 2006; Tsaadon y cols. 2006). Sin embargo estas funciones atribuidas clásicamente de forma exclusiva a la ZP son cuestionables en algunos casos.

En otros vertebrados como los peces, anfibios y reptiles, las capas que rodean al ovocito son denominadas corion, membrana vitelina o membrana perivitelina, respectivamente. Estas estructuras son similares en grosor y función a las de los mamíferos, por lo que pueden ser referidas colectivamente como ZP (Spargo y Hope, 2003).

La ultraestructura y funciones de la ZP, al igual que su composición bioquímica y molecular han sido objeto de numerosos estudios en diferentes especies durante los últimos 25 años (Bleil y Wassarman, 1980; Dunbar y cols., 1994; Wassarman y cols., 2005).

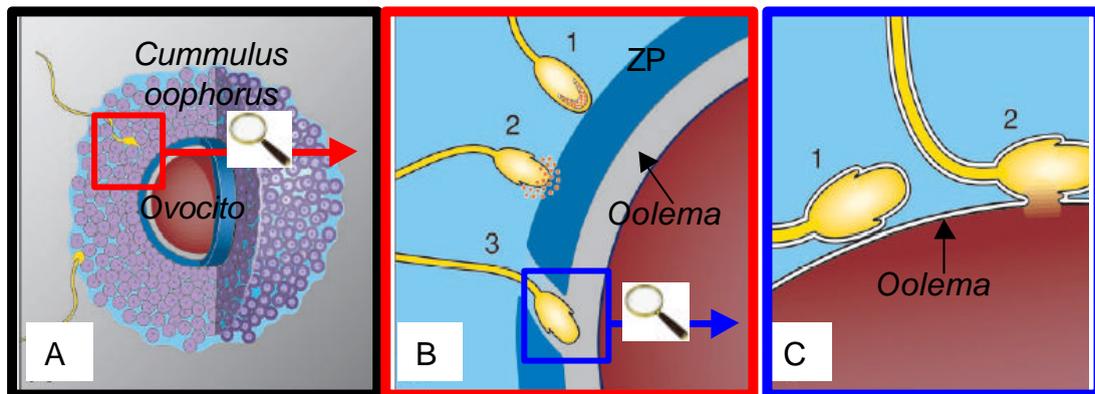


Figura 1. Representación esquemática de la adhesión y fusión del espermatozoide con el ovocito. (Modificado de Primakoff y Myles, 2002). **A)** Espermatozoide penetrando las células del *cumulus oophorus*. **B)** Unión a la ZP (1). Exocitosis del acrosoma (2). Penetración de la ZP (3). **C)** Unión al oolema (1). Fusión a nivel del segmento ecuatorial (2).

En algunas especies la ZP está morfológicamente estructurada en capas, observando una diferente asimetría entre la capa interna y la externa (Philips y Shalgi, 1980; Shalgi y Raz, 1997) la cual se pone de manifiesto utilizando lectinas y anticuerpos específicos para ZP (Avilés y cols. 2000; Sinowatz y cols., 2001). Estudios mediante microscopía electrónica de barrido convencional han mostrado que la ZP es una estructura porosa, con forma de red y aspecto compacto. Cuando se utilizan técnicas más sofisticadas, con alta resolución, se observa una estructura de finos filamentos interconectados, con un patrón regular de alternancia de “amplias y estrechas mallas” (Familiari y cols., 2006).

Diferentes autores han estudiado si existe relación entre las variaciones ultraestructurales de la ZP y el estado de maduración del ovocito, e incluso si existen diferencias entre ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Los estudios indican que la ZP del ovocito inmaduro se caracteriza por tener una apariencia de red fina poco estructurada con numerosas perforaciones profundas, a diferencia de la ZP del ovocito maduro que presenta una apariencia de red mejor estructurada y con perforaciones menos profundas, que posteriormente desaparecen cuando el espermatozoide se une a la ZP, probablemente por la

fusión de varias capas de la red de la ZP (Sinowatz y cols., 2001; Funahashi y cols., 2000). En la especie porcina, Rath y cols., (2005) observaron que los ovocitos madurados *in vitro* durante 48 horas presentaban una estructura similar a los ovocitos inmaduros, con gran número de poros quizás debido a que la retracción de los microfilamentos estaba retrasada o era incompleta, mientras que los ovocitos madurados sólo durante 24 horas presentaban un aspecto más parecido a los madurados *in vivo*. Sin embargo, a pesar de los resultados mencionados, Familiari y cols., (2006), apuntan que estos deben ser interpretados con precaución, debido a que el procesado de las muestras para microscopía electrónica provoca artefactos en las mismas.

En cuanto al tamaño de la ZP, el grosor de la misma en mamíferos varía notablemente según la especie: 5 μ m en ratón, 13-16 en el cerdo, 20 μ m en la especie humana y 27 μ m en la vaca (Dunbar y cols., 1994; Pelletier y cols., 2004).

En el ratón, especie mejor conocida hasta el momento, se describe que la ZP está formada por un entramado de fibras, las cuales están constituidas por las distintas glicoproteínas (Wassarman y cols. 1996). Las fibras se componen de dímeros de ZP2:ZP3 unidos entre sí por moléculas de ZP1. Sin embargo, Dean (2004) propone que los filamentos que forman la ZP están compuestos por dímeros de ZP1:ZP3 y ZP2:ZP3.

Diferentes estudios sobre la ZP muestran que está compuesta principalmente por glicoproteínas sulfatadas (Bleil y Wassarman, 1980) con algunas diferencias específicas de especie (Green, 1997; Avilés y cols., 2000). Además, la ZP contiene receptores para la unión de espermatozoides, los cuales restringen la unión de espermatozoides de especies heterólogas, sin embargo, existen referencias que demuestran que no siempre esa especificidad funciona de forma estricta (Bedford, 1977; Lee y cols., 1987; Sinowatz y cols., 2003; Delle Monache y cols., 2003).

Como ya hemos mencionado, en la mayoría de especies son tres las glicoproteínas que conforman la ZP, aunque recientemente se ha descrito la presencia de una cuarta proteína en la ZP humana (Lefievre y cols., 2004), en la ZP de rata (Hoodbhoy y cols., 2005) y en la ZP de hámster (Jiménez-Movilla, 2005; “Genbank” bankit821091, DQ838550).

Las glicoproteínas de la ZP son el producto de tres familias de genes mayores, denominados ZP A, ZP B y ZP C de acuerdo al tamaño de sus ADN mensajeros (Harris y cols., 1994). Los genes que codifican las proteínas de la ZP de varias especies de mamíferos se han clonado y sus secuencias genéticas muestran un alto grado de conservación. Además, en diferentes especies, la estructura de polipéptidos primaria, incluyendo el número y posición de la mayoría de residuos cisteína y potenciales puntos de N-glicosilación, mantiene un alto grado de conservación (Harris y cols., 1994). Sin embargo, se observa una importante diferencia en cuanto a la masa molecular según las especies, al parecer debida a la diferente glicosilación de las proteínas de la ZP (Shalgi y Raz, 1997). Estudios citoquímicos manifiestan variaciones según la especie en cuanto a la expresión y distribución de los azúcares terminales a través de la ZP (Avilés y cols. 1996, 1999, 2000; Jiménez-Movilla y cols. 2004).

Las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas se clasifican en dos familias en función del tipo de unión entre los oligosacáridos y la cadena polipeptídica, esto es, oligosacáridos N-unidos y O-unidos (Benoff, 1997). Todas las glicoproteínas de la ZP poseen oligosacáridos N-unidos y O-unidos (Noguchi y Nakano, 1992; Boja y cols. 2003). El componente glucídico puede llegar a constituir el 50% de la masa de algunas de las proteínas de la ZP. Además, los carbohidratos juegan un papel fundamental en la interacción espermatozoide-ovocito (Benoff, 1997; Nakano y Yonezawa, 2001; Dell y cols. 2003).

La organización de la ZP en distintas capas, según se ha comprobado por microscopía en varias especies, aparece acompañada por una distribución espacial de determinados azúcares a través del espesor de la ZP. Los patrones

de unión a lectinas en diferentes especies demuestran una alta especificidad (Sinowatz y cols., 2001a; Avilés y cols. 1994, 2000).

En el cerdo, las glicoproteínas de la ZP se pueden separar mediante electroforesis en dos componentes con masa molecular de 55.000 y 90.000 Da (Hedrick y Wardrip, 1987), pero esto solamente se consigue si se han deglicosilado parcialmente con endo- β -galactosidasa previamente. El primero de ellos representa el 80% del total de la proteína, y está formado por dos polipéptidos denominados pZPB y pZPC. La actividad de receptor espermático se ha atribuido a la pZPB (Yonezawa y cols. 1997) a diferencia del ratón que se atribuye a la ZPC (ZP3).

Los oligosacáridos N-unidos liberados por hidrazinólisis de la fracción de peso molecular de 55000 Da se separan en cadenas de carbohidratos neutras (28%) y ácidas (72%) (Noguchi y cols., 1992). Un ensayo de competición reveló que la mezcla de las cadenas neutras poseía actividad como receptor espermático, mientras que las cadenas ácidas no poseían dicha actividad.

1.1.2.2. Funciones de la ZP

La ZP es una estructura con múltiples funciones en los mamíferos. Interviene en numerosos procesos desde la ovulación hasta el estadio de blastocisto eclosionado.

Entre las funciones más importantes que esta estructura desempeña hasta el momento de la fecundación destacan las siguientes: protección del ovocito, regulación de la interacción espermatozoide-ovocito estableciendo cierta especificidad de especie, inducción de la RA y prevención de la polispermia.

La ZP actúa como barrera de protección mecánica para el embrión. Las propiedades físicas de la ZP no se han estudiado en profundidad, pero se comprueba de forma práctica que se comporta como una estructura sólida con

cierta elasticidad (Green, 1987). Además cuando los ovocitos con la ZP intacta son sometidos a un vigoroso pipeteo, la ZP se puede romper y fragmentarse sin pérdida de la estructura esférica de los fragmentos (Green, 1997).

La regulación de la interacción espermatozoide-ovocito la desempeña proporcionando receptores para la unión del espermatozoide, haciendo que dicha unión presente cierta especificidad de especie; por ello también se le atribuye la función de prevenir la penetración heteróloga. Los receptores espermáticos de la ZP se revisarán con detenimiento en el apartado de modelos de unión espermatozoide-ZP.

Además de su papel en la unión, la ZP también es responsable de la inducción de la RA. Se reconoce que es la ZP3 la proteína que desencadena la RA en espermatozoides (Yanagimachi, 1994). Aunque los oligosacáridos de la ZP son los que se unen al espermatozoide, dichos oligosacáridos o pequeños glicopéptidos de la ZP3 aislados son incapaces de inducir la RA (Leyton y Saling, 1989), implicando la necesidad de la porción proteica.

Después de la fecundación, la ZP es la responsable de evitar la disgregación de los blastómeros, facilitar el tránsito del embrión a través del oviducto y prevenir la adhesión de forma prematura del embrión al oviducto y la superficie endometrial (Nichols y Gardner, 1989).

Además la ZP es capaz de proteger al embrión contra determinados agentes patógenos (bacterias, virus) y toxinas; modula el intercambio de nutrientes y las señales embrio-maternales tempranas (Nichols y Gardner, 1989; Herrler y Beier, 2000).

El enfoque original para identificar la función de las proteínas de la zona fue añadir cada proteína aislada a los espermatozoides y determinar cual podía unirse al espermatozoide y bloquear competitivamente su unión al ovocito. Bajo estas condiciones solamente la ZP3 aislada de ovocitos no fecundados inhibe de

forma competitiva la unión de los espermatozoides a la ZP, mientras que ZP1 y ZP2 no provocan este bloqueo. Esto sugiere que la ZP3 es la proteína de la ZP donde se une el espermatozoide (Bleil y Wassarman, 1986; Mortillo y Wassarman, 1991; Shur y cols. 2006).

Generalmente los estudios hechos con proteínas individualizadas de la ZP porcina han usado proteínas sometidas a tratamiento enzimático con endo-**b**-galactosidasa, lo cual se debe tener en cuenta. Aunque la ZP1 porcina tratada con endo-**b**-galactosidasa conserva alguna actividad de unión al espermatozoide, la deglicosilación parcial de otras proteínas de zona podría influir en su actividad como receptor espermático. Además, puede provocar la eliminación de algunos oligosacáridos de la ZP1 críticos en la unión del espermatozoide, que conllevarían una disminución en la actividad de unión de dicha molécula (Miller y cols., 2002).

1.1.2.3. Modelos de unión espermatozoide-ZP

A pesar de las numerosas investigaciones llevadas a cabo para conocer las bases moleculares de la unión de espermatozoides a ZP, no existe un modelo único aceptado para los mamíferos (Rankin y cols., 2003; Dean, 2004).

Mientras que en el ratón, que es el modelo mejor desarrollado, se acepta que los oligosacáridos de la ZP3(ZPC) son los responsables de la unión del espermatozoide, en otros animales, la situación es menos clara. En el cerdo y en la vaca hay evidencias de que la ZP3 α o ZP4 (ZPB), se une al espermatozoide (Yurewicz y cols., 1998; Yonezawa y cols., 2001).

Los modelos que postulan la participación de determinados glúcidos O-unidos y N-unidos como receptores espermáticos implican a las glucosidasas de los gránulos corticales como responsables de la eliminación de esos glúcidos tras la fecundación. En ratón se propone que los espermatozoides se unen a glúcidos

del tipo O-unidos de la ZP3 y que estos son eliminados después de la fecundación (Florman y Wassarman, 1985; Miller y cols., 1992; 1993). Sin embargo otros estudios evidencian el papel de las cadenas de oligosacárido N-unidas en la unión del espermatozoide en bovino y porcino (Amari y cols., 2001; Nakano y Yonezawa, 2001; Yonezawa y cols., 2001).

En el caso de la especie bovina, Amari y cols. (2001) proponen una cadena con cinco residuos de manosa, del tipo N-unida, como responsable de la unión del espermatozoide. Sin embargo, recientemente nuestro grupo (Velasquez y cols., 2006) ha demostrado la implicación del ácido siálico en la unión del espermatozoide a la ZP bovina, aunque todavía no se conoce el tipo de glicoproteína al que está unido ese ácido siálico.

Actualmente se cuestionan los modelos que proponen a los oligosacáridos como responsables de la unión del espermatozoide a la ZP, en vista de los resultados contradictorios que han sido obtenidos en la última década al respecto. Alternativamente se plantea que la función de los oligosacáridos en el proceso de unión espermatozoide-ZP quedaría restringida al establecimiento de la especificidad de especie (para revisión ver Clark y Dell, 2006).

El modelo supramolecular descrito por el grupo del Dr. Dean propone que es la estructura supramolecular de las proteínas la que determina la unión del espermatozoide a la ZP, la cual es modificada por una proteasa liberada desde los gránulos corticales. El mencionado modelo se propone a raíz de los resultados obtenidos por Rankin y cols. (1998; 2003) utilizando animales transgénicos, en los que se han introducido los genes de ZP2 y ZP3 humana. Los resultados demuestran que aunque se expresa ZP2 y ZP3 humana en los ovocitos de ratón no hay unión de espermatozoides humanos, mientras que los espermatozoides de ratón se unen, incluso después de haberse producido la reacción cortical.

Según este modelo, la ZP formada por ZP2 y ZP3 con una disposición tridimensional específica, sería responsable de la capacidad de unión del

espermatozoide, de modo que según han descrito diferentes autores (Barros y Yanagimachi, 1972; Wolf y Hamada, 1977), tras la unión de un espermatozoide y extrusión de los gránulos corticales, se produciría una modificación o “cleavage” de la ZP2 que provocaría una modificación de la estructura supramolecular, un cambio en la conformación espacial que impediría que se puedan unir más espermatozoides. En este modelo, aunque no se descarta la participación de los carbohidratos, no sería necesaria su modificación tras la fecundación. Este modelo supramolecular explicaría los resultados obtenidos con ratones en los que no hay ZP1 y que forman una ZP compuesta de ZP2 y ZP3 la cual, aunque estructuralmente es defectuosa, continúa teniendo la capacidad de unir espermatozoides, siendo los ratones “knockout” de ZP1 fértiles (Rankin y cols., 1999).

1.1.2.4. Especificidad de especie en la unión a ZP

Desde tiempos inmemoriales se conoce que existen híbridos de determinadas especies de mamíferos, por ejemplo las mulas, que son viables. Sin embargo, la existencia de barreras que impiden la fecundación entre diferentes especies es una evidencia, que comienza en el acoplamiento entre macho y hembra, acabando en la interacción espermatozoide-ovocito. En la fecundación *in vitro*, donde las demás barreras se han suprimido, es la interacción espermatozoide-ovocito la que tiene mayor importancia.

Aunque la unión espermatozoide-zona no es completamente específica de especie, sí se sabe que presenta grandes restricciones de especie (Schmell y Gulyas, 1980; Moller y cols., 1990; Rankin y Dean, 2000; Hoodbhoy y cols., 2005). El espermatozoide se une a esta formidable barrera y sufre la exocitosis del acrosoma para atravesarla (Yanagimachi, 1994).

In vitro, se han obtenido fecundaciones heterólogas interespecie utilizando ovocitos madurados *in vitro* (Slavik y cols., 1990; Slavik y Fulka, 1992; 1999) aunque se trata de casos aislados. Sin embargo, se ha descrito la penetración de

espermatozoides de diferentes especies en ovocitos sin ZP de especies heterólogas (Yanagimachi y cols., 1976; Gardon y cols., 2001; Zhao y cols., 2002).

Se admite que la ZP es la principal barrera que impide la fecundación interespecífica (Yanagimachi, 1994; Hoodbhoy y cols. 2005; Florman y Ducibella, 2006), aunque las secreciones oviductales también han sido implicadas en el establecimiento de la especificidad de especie (Wang y cols, 1998; Slavik y Fulka, 1999). Una de las pruebas de que la ZP actúa como barrera, es que cuando esta se elimina, los ovocitos pueden ser penetrados por espermatozoides de numerosas especies heterólogas (Yanagimachi y cols., 1976; Gardon y cols., 2001; Zhao y cols., 2002).

Existen referencias bibliográficas que demuestran que es posible observar interacciones heterólogas espermatozoide-ZP. Sinowatz y colaboradores (2003) observaron unión e inducción de la RA en espermatozoides porcinos y equinos con ZP bovina. En la especie humana, Lee y colaboradores (1987) comprobaron que la ZP de ratón solubilizada mediante tratamiento con ácido inducía la RA en espermatozoides humanos. También se ha demostrado que una molécula denominada Gp273, responsable de la interacción espermatozoide-ovocito en un molusco bivalvo, tiene capacidad de unirse a espermatozoides humanos e inducir la RA (Delle Monache, 2003).

Estos datos sugieren que una estricta especificidad de especie en la unión primaria no debe existir, al menos en todas las especies (Focarelli y cols., 2001). Hartmann (1983) ya sugirió que bajo condiciones *in vitro*, la especificidad de especie en las interacciones espermatozoide-ZP podría ser menos restrictiva, quizás por la ausencia de interacción entre los ovocitos y las secreciones oviductales implicadas en el establecimiento de la especificidad (Slavik y Fulka, 1999).

1.1.2.5. Receptores del espermatozoide y la ZP

Un gran número de receptores espermáticos para proteínas de la zona han sido estudiados, pero su mecanismo de acción sigue sin conocerse totalmente. Identificar los receptores de las proteínas de la zona se ha demostrado que es más complicado que determinar sus ligandos en la ZP, probablemente por la gran complejidad de la superficie espermática en comparación con la ZP (Thaler y Cardullo, 1996). Varios receptores han sido aislados basándose en su afinidad por la ZP. En el ratón, Bleil y Wassarman (1990) demostraron la existencia de una molécula denominada "sp56", con afinidad por la ZP (Kim y cols. 2001). Posteriormente se ha comprobado la existencia de dicha molécula a nivel de la membrana acrosomal externa, y su afinidad por las cadenas de oligosacáridos de la ZP reconocidas por el espermatozoide (Cheng y cols., 1994). En la especie porcina se ha descrito la existencia de zona adhesinas, proacrosina, sp38, P47 y un grupo de proteínas llamadas espermadhesinas basándose en su afinidad por la ZP, aunque los ligandos de zona específicos para este grupo de moléculas no se conocen (Hardy y Garbers, 1995).

A nivel del espermatozoide una de las moléculas más estudiadas como ligando de los receptores de la zona ha sido la ***β***-1,4 Galactosiltransferasa (Gal T). Entre sus funciones se encuentra la que le da nombre, por su capacidad de añadir galactosa a las glicoproteínas y glicolípidos con residuos terminales N-acetilglucosamina. GalT-I como molécula de la membrana plasmática, puede actuar como un receptor específico de glicoproteína incluyendo ZP3 (Miller y cols., 1992; Shur y cols. 2006)

Todos los ligandos conocidos para GalT-I tienen residuos terminales N-acetilglucosamina. Sin embargo el terminal N-acetilglucosamina no es suficiente para que una glicoproteína se una como ligando. Por ejemplo, ZP1 y ZP2 tienen residuos N-acetilglucosamina como terminales no reducidos pero no son ligandos para la GalT-I (Miller y cols., 1992).

La importancia biológica de la GalT-I y la adhesión a la ZP3 se ha comprobado en varios ensayos *in vitro*. En experimentos usando la ZP intacta, el bloqueo o eliminación de los residuos N-acetilglucosamina reduce la unión de espermatozoides (Lopez y cols., 1985). Cuando dichos residuos N-acetilglucosamina son bloqueados o eliminados de la ZP3 solubilizada, ésta pierde su capacidad para unir espermatozoides (Miller y cols., 1992). Estos resultados sugieren que la interacción entre GalT-I y ZP3 es necesaria para la unión entre gametos. Sin embargo, parece no ser totalmente imprescindible, ya que Rodeheffer y Sur (2004) demostraron la unión de espermatozoides a la ZP utilizando ratones transgénicos sin Gal T-I, aunque el número de espermatozoides unidos fue menor, por lo que se sugiere que en ovocitos ovulados existe otro ligando independiente de ZP3, además de Gal T-I, que permite la unión del espermatozoide a la ZP pero que no participa en la exocitosis del acrosoma.

Además se ha identificado otra proteína espermática que también participa en la unión del espermatozoide a la ZP denominada SED1 (Ensslin y Sur, 2003), la cual se une específicamente a la ZP de ovocitos no fecundados, pero no a ovocitos ya fecundados.

1.1.3. Reacción acrosómica

La RA es un proceso que, *in vivo*, ocurre tras la capacitación y consiste en la exocitosis que se produce como consecuencia de la fusión, de la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa, provocando la liberación del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994). El tiempo necesario para que se produzca dicho proceso varía según las condiciones y la especie. En ratón oscila desde 2 minutos, utilizando ZP solubilizada para la estimulación, hasta 130 minutos con ZP intacta (Lee y Storey, 1989; Rockwell y Storey, 2000). En humanos, Morales y cols. (1994) observaron tiempos entre 15 y 60 minutos utilizando ZP intacta.

La RA está mediada por una compleja interacción de señales celulares, las cuales incluyen activación de proteínas quinasas y su consecuente fosforilación, activación de canales iónicos y otros procesos aún por definir (Aitken, 1997; Breitbart, 1997; 2002; Visconti y cols., 1999; Herrick y cols., 2005), aunque algunos de estos se describen como característicos del proceso de capacitación.

Se acepta que la ZP proporciona receptores específicos de especie para la unión del espermatozoide, sin embargo, desconocemos si la RA es el mecanismo por el cual se establece la especificidad de especie y también se desconoce el lugar en el cual ocurre la RA durante la fecundación en condiciones fisiológicas (Kirkman-Brown y cols., 2002).

1.1.3.1. Regulación del calcio intracelular durante la R.A.

Al igual que en las neuronas, células adrenales y otros sistemas de exocitosis, un aumento citosólico en la concentración de Ca^{2+} es suficiente y necesario para que se produzca la exocitosis del acrosoma, desencadenándose la RA (Yanagimachi, 1994). Existen dos mecanismos por los cuales la concentración citosólica de calcio puede aumentar. El primero mediante entrada de Ca^{2+} a través de los canales iónicos de la membrana plasmática, ya que en las células de mamíferos, la concentración de Ca^{2+} extracelular (del orden de 1-10 mM) es bastante mayor que los niveles en citoplasma (entorno a 50-100 nM), por lo que la apertura de dichos canales permite la difusión de Ca^{2+} al interior de la célula (Burgoyne y Morgan, 1995). El segundo mecanismo que las células utilizan para aumentar la concentración citosólica de este ión es mediante la salida de Ca^{2+} secuestrado en depósitos intracelulares, tales como el retículo endoplasmático liso (Berridge, 1997). Se conocen diferentes canales intracelulares de calcio de este tipo, entre ellos el IP3 R (receptor del inositol 1,4,5 trifosfato), que se ha localizado a nivel de la región acrosomal.

Aunque existen evidencias de que los espermatozoides movilizan Ca^{2+} tanto del medio extracelular como de los depósitos intracelulares, no se conocen los mecanismos precisos. Existen indicios de que el acrosoma pudiera actuar como depósito intracelular de calcio, lo cual ha sido demostrado en ratón (Herrick y cols., 2005).

Se acepta de forma general que durante la RA hay una respuesta temprana de los canales dependientes de voltaje que provocan un aumento de calcio inicial de escasa magnitud el cual es seguido de un aumento sostenido de calcio a través de los "SOCs" (*store operated channels*), pero el proceso que actúa como nexo de unión permanece sin esclarecer totalmente. Recientemente, Herrick y cols. (2005) demostraron en ratón que es el acrosoma el responsable de la liberación del calcio que se produce entre los dos eventos antes citados. El calcio acumulado a nivel del acrosoma es secuestrado durante el proceso de capacitación. Además, también afirman que, en el ratón, el calcio almacenado a nivel del acrosoma es suficiente para provocar la exocitosis del mismo sin presencia de calcio extracelular, aunque la movilización del calcio podría ser una combinación de ambos.

Un modelo para explicar los diferentes mecanismos implicados en el aumento de calcio intracelular que se produce en el espermatozoide como consecuencia de su unión a la ZP y que conlleva la exocitosis del acrosoma es el propuesto por Breitbart y cols. (1997), (**Figura 2**).

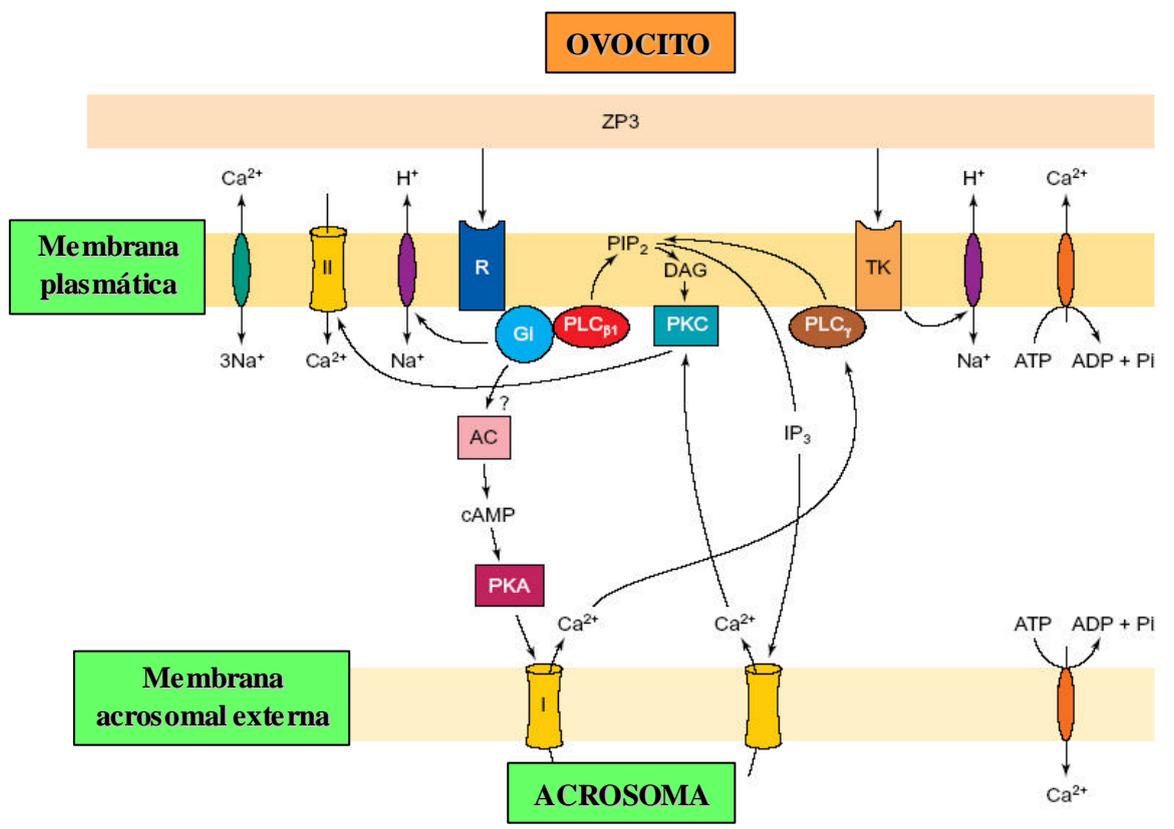


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos implicados de RA. (Modificado de Breitbart y cols. 1997).

En dicho modelo se propone que el espermatozoide se une a la ZP3, probablemente mediante oligosacáridos, al menos a través de dos receptores diferentes (indicados con flechas en la Figura 2) a nivel de su membrana plasmática. Uno de los receptores (R) está acoplado a una proteína G, la cual activa la fosfolipasa C β_1 (PLC β_1) y podría regular la actividad de la adenilato ciclasa (AC) para producir AMPc y activar la proteín-quinasa A (PKA). Esta PKA activaría un canal dependiente de calcio situado a nivel de la membrana acrosomal externa, que liberaría Ca^{2+} desde el interior del acrosoma hacia el citosol. Este es el primer aumento de Ca^{2+} intracelular, relativamente pequeño, el cual permite la activación de la fosfolipasa C (PLC γ).

La activación de las fosfolipasas PLC β_1 (mediante la proteína G acoplada al receptor R) y la PLC γ (mediante el ligero aumento de calcio por movilización desde el acrosoma), generaría la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) para formar inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG).

La PKA y el IP₃ activarían los canales de Ca²⁺ en la membrana acrosomal externa provocando aumento de calcio intracelular mediante movilización desde el acrosoma.

Por otro lado el diacilglicerol (producto de la hidrólisis del PIP₂) activa la PKC, la cual provoca la apertura de los canales de calcio en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca²⁺ extracelular al citosol. Como consecuencia se produce un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular y la concentración acrosomal disminuye dando lugar a la apertura de los canales de Ca²⁺ de los almacenes, mecanismo denominado "SOC, store opens channels", lo que provoca un aumento sostenido de la concentración de Ca²⁺ citosólico. Este fenómeno "SOC" llamado "capacitative calcium entry" se produce en un gran número de células y consiste en que la liberación de calcio de los depósitos de la célula, a su vez también promueve la entrada de calcio extracelular a través de la membrana plasmática (Berridge y Irvine, 1989). Este mecanismo no se conoce totalmente, pero se acepta el principio de que la apertura de un canal de calcio en la membrana plasmática es debido a la reducción de calcio en las reservas internas (Putney, 1990).

1.1.3.2. Fusión de membranas y exocitosis

Hasta el inicio de la RA la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se mantienen separadas mediante una estructura de filamentos de F-actina formada durante la capacitación y dependiente de la activación de la proteína-quinasa A, fosforilación en tirosina de algunas proteínas y la activación de

la fosfolipasa D (PLD). Esta estructura a modo de “andamiaje” mantiene separadas ambas membranas, evitando que se fusionen y se libere el contenido del acrosoma (Breitbart y cols., 2005).

Durante la RA, es necesario que se produzca la despolimerización de la F-actina, por ser un requisito necesario para que la membrana acrosomal externa y la parte interna de la membrana plasmática puedan ponerse en contacto íntimamente y fusionarse.

Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular (sobre 500nM) que se producen como consecuencia de la inducción de la RA, según el modelo antes descrito, provocan la activación de proteínas “cortadoras” de actina, que inducen la ruptura de los filamentos de actina y el desmantelamiento de la estructura de sostén entre ambas membranas que las mantenía separadas (Breitbart y cols. 2005). Spungin y cols., en 1995 observaron que la inhibición de la despolimerización de la actina, mediante el uso de faloidina provoca la inhibición de la RA.

1.1.4. Interacción con la membrana plasmática (olema)

Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP y ha sufrido la RA, el siguiente proceso es contactar con el ovocito, mediante la interacción entre ambas membranas plasmáticas. Tras la RA se provoca una remodelación de la superficie del espermatozoide, quedando además expuesta una nueva superficie de membrana, la membrana acrosomal interna, que es la que establece el primer contacto con las microvellosidades del ovocito, según se ha demostrado en roedores (Talbot y Chacon, 1982). A continuación se produce la unión y fusión entre la membrana plasmática del ovocito y la del espermatozoide a nivel del segmento ecuatorial. Previamente durante la capacitación se producen modificaciones entre las que se incluyen el desenmascaramiento de puntos de unión y el desplazamiento de los sitios de unión para permitir la fusión, al igual que la migración de proteínas (de Lamirande y cols. 1997).

Una compleja serie de interacciones moleculares acontecen durante la interacción de las membranas de los gametos, que se inicia con una primera unión o “attachment”. Posteriormente tiene lugar la adhesión celular propiamente dicha entre los dos gametos, para culminar con la fusión de las dos membranas, que tiene como resultado la formación de una célula fruto de la unión de otras dos (Evans, 2002).

Numerosos estudios, realizados hace décadas y algunos más recientes, implican varias moléculas a nivel del espermatozoide y del ovocito como responsables de la interacción. Durante los últimos quince años, se ha desarrollado un modelo que sugiere que la unión espermatozoide-oolema es el resultado de la adhesión entre las integrinas existentes a nivel del ovocito y los ligandos de estas integrinas presentes en el espermatozoide. La identificación de las proteínas implicadas es uno de los principales objetivos de numerosos proyectos de investigación (Evans, 1999).

Las proteínas espermáticas que han recibido mayor protagonismo como responsables del proceso presentan homología con las desintegrinas. Estas proteínas espermáticas son miembros de una familia de moléculas, conocida como ADAM (*A Disintegrin And a Metalloprotease*) o MDC (*Metalloprotease, Disintegrin, Cysteine-rich*) entre las que destacan la proteína 1 secretora rica en cisteína (CRISP1) y las proteínas de la familia ADAMs (fertilina α ó ADAM1; fertilina β ó ADAM2 y ciritestina ó ADAM3). Además se ha descrito la existencia de una familia de proteínas tipo inmunoglobulinas, denominadas “Izumo” que son necesarios para que se produzca la fusión. Inoue y colaboradores (2005) obtuvieron ratones sin el gen “Izumo” y comprobaron que los espermatozoides que producían eran aparentemente normales, con capacidad para unirse y penetrar la ZP, pero eran incapaces de fusionarse con el oolema de ovocitos de hámster sin ZP.

Respecto al ovocito, las proteínas que se consideran implicadas en esta interacción son denominadas integrinas ($\alpha_6\beta_1$ y otras) y *tetraspaninas* (CD9) (Evans, 2002; Kaji y Kudo, 2004). Sin embargo, He y colaboradores (2003) de acuerdo a los resultados que obtuvieron afirman que ninguna de las proteínas ADAM o integrinas presentes en ratón es imprescindible para la unión y fusión entre gametos.

Los modelos animales han proporcionado hasta el momento la mayoría de la información existente sobre interacciones entre gametos, habiéndose comprobado posteriormente si dichas moléculas están involucradas en los procesos de fecundación en humanos.

Una de las principales barreras para la identificación de las moléculas responsables del proceso de unión y fusión de gametos es la falta de un ensayo *in vitro* de unión espermatozoide-ovocito que simule las condiciones fisiológicas (Talbot y cols., 2003).

El proceso de fusión de membranas puede ser dividido en tres eventos claves. El primero consiste en el reconocimiento de membranas o "attachment", se trata de un contacto inicial entre las dos membranas mediado por uniones proteína-proteína o por uniones proteína-carbohidrato. El segundo, consiste en la aposición de las membranas; la actividad fusogénica de las proteínas conlleva que las dos membranas tengan un contacto íntimo y se produzca la adhesión uniéndose físicamente las dos membranas (a través de interacciones proteína-lípido o proteína-proteína). Entonces se induce un cambio de conformación irreversible en el que las proteínas se doblan sobre sí mismas. El tercer evento corresponde a la mezcla de lípidos; una vez que las membranas están en contacto, se produce la mezcla de lípidos dando como resultado una bicapa que permite la continuidad citoplasmática entre las dos células (Jahn y Grubmuller, 2002).

La fusión queda restringida a una región específica de cada gameto, la cual puede reflejar una composición proteica, organización de lípidos o morfología de membrana determinada para esa región. La porción de la membrana plasmática del espermatozoide que cubre parte del acrosoma y que no se fusiona durante la RA se denomina región ecuatorial y es la zona donde se inicia el proceso de fusión en el espermatozoide (Yanagimachi, 1988; **Figura 3**). Aunque la fusión del espermatozoide al oolema puede producirse en posición perpendicular o paralela, generalmente siempre se produce mediante la región central de la membrana plasmática, en la proximidad o a nivel de la región ecuatorial (Gaddum-Rosse, 1985). A nivel del oolema, se observa la presencia de microvellosidades en la mayoría de la superficie; en roedores, la zona que recubre la placa metafásica no presenta microvellosidades y la fusión raramente ocurre a este nivel, no apareciendo a este nivel moléculas de CD9, ni integrinas.

Tras la RA, el segmento ecuatorial y la región posterior de la cabeza del espermatozoide se adhieren y se fusionan con la membrana del ovocito (Berford y cols., 1979). En roedores los espermatozoides con acrosoma intacto pueden adherirse a la membrana del ovocito, pero sólo los espermatozoides reaccionados pueden fusionarse (Yanagimachi y Noda, 1970). En espermatozoides humanos, hay evidencias de que la RA es importante para la adhesión a la membrana del ovocito. Las uniones iniciales (*attachments*) del espermatozoide a la membrana son reversibles y parecen requerir de la motilidad espermática para que se produzcan (Wolf y Armstrong, 1978), aunque espermatozoides con pobre motilidad pueden fusionarse con ovocitos (Yanagimachi, 1988). Los movimientos de la cola del espermatozoide disminuyen y desaparecen unos pocos segundos después de que la fusión se haya producido (Wolf y Armstrong, 1978).

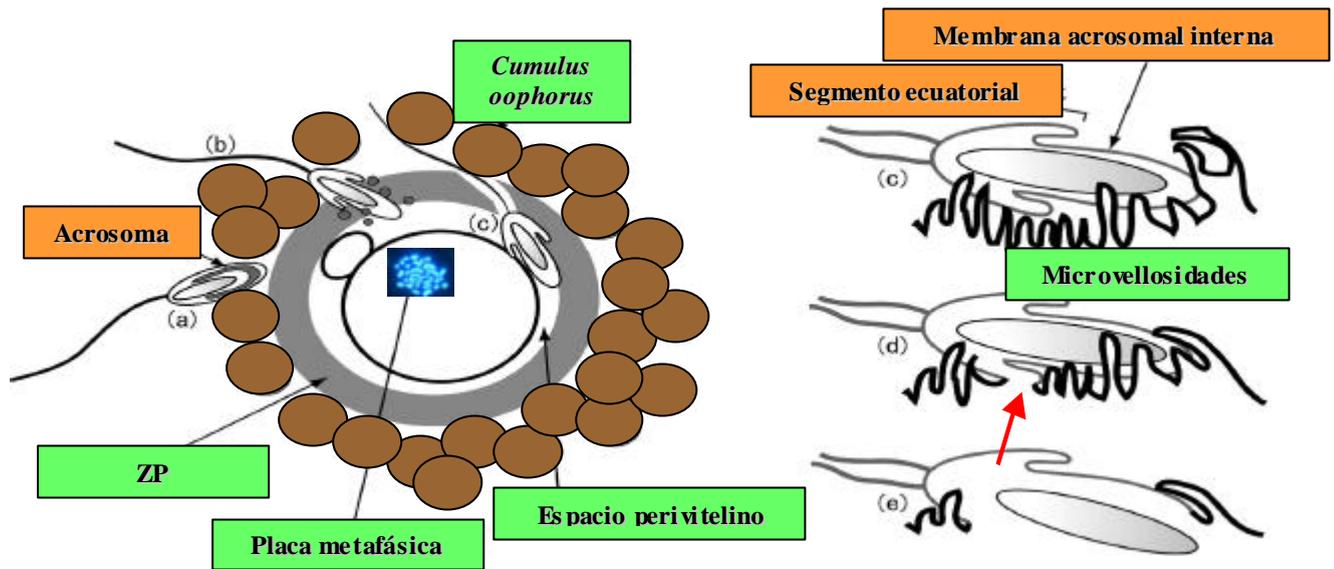


Figura 3. Representación esquemática de las interacciones espermatozoide ovocito.

(Modificado de Kaji y Kudo 2004). a) El espermatozoide atraviesa el CO y se une a la ZP. b) Tras la unión a la ZP se produce la RA. c) El espermatozoide atraviesa la ZP y se une al oolema. c) Detalle de la unión del espermatozoide al oolema. d) La fusión se inicia a nivel del segmento ecuatorial (flecha roja). e) Tras la fusión el oolema va englobando al espermatozoide.

1.1.4.1. Métodos de estudio de los mecanismos de interacción

El ensayo más utilizado para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la interacción del espermatozoide con el oolema ha sido la inseminación de ovocitos sin ZP. Mediante la adición de anticuerpos, proteínas, o azúcares que podrían bloquear la unión y fusión del espermatozoide al oolema se han ido describiendo moléculas que intervienen en el proceso.

En estos ensayos la principal variable que se mide es el número de espermatozoides adheridos al ovocito. Se admite que todos los espermatozoides unidos a la membrana plasmática del ovocito pueden acabar fusionándose. Sin embargo, se sabe que la eliminación del gen "Izumo" permite la unión de los espermatozoides pero no su fusión con la membrana (Nioue y cols., 2005) por lo que el significado biológico del número de espermatozoides unidos a la membrana es un dato poco preciso (Evans, 2002).

Además en el conjunto de espermatozoides unidos se incluyen varias poblaciones, y algunos de ellos se unen mediante interacciones que no les permitirán posteriormente fusionarse. Por ejemplo, espermatozoides de roedores con acrosoma intacto pueden unirse a ovocitos libres de ZP pero no pueden fusionarse (Yanagimachi, 1994). En la mayoría de ensayos se utilizan largos periodos de tiempo de coincubación (20-24 horas), lo cual no permite diferenciar entre los espermatozoides que se unen rápidamente (antes de que exista fusión de algún espermatozoide al ovocito) y los que se unen de forma tardía (cuando ya se ha unido algún espermatozoide al ovocito), teniendo en cuenta que la fusión de un espermatozoide podría cambiar la habilidad del ovocito para que se unan espermatozoides adicionales.

Los ovocitos fecundados de ratón todavía son capaces de unir espermatozoides incluso después de perder la habilidad para que se fusionen (1 hora después de la fusión inicial; Maluchnik y Borsuk, 1994). Se ha planteado que los espermatozoides se unen con diferentes afinidades por lo que se ha sugerido que los ensayos de unión podrían mejorarse mediante la estandarización de las técnicas de lavado, de modo que seleccionen solamente los espermatozoides unidos con alta afinidad (Redkar y Olds-Clarke, 1999).

Como herramienta para la identificación de las moléculas implicadas, el uso de anticuerpos monoclonales anti-espermatozoide que inhibían la fecundación sugirió la participación de algunas moléculas en este proceso. Posteriormente, fueron los estudios genéticos los que permitieron la manipulación de genes, obteniendo animales con genes modificados sobre los cuales se puede comprobar su implicación en la fusión de gametos (Kaji y Kudo, 2004; Nioue y cols., 2005).

El estudio de sistemas heterólogos (ovocitos y espermatozoides de diferentes especies) también se ha utilizado. Los ovocitos de hámster libres de ZP son comúnmente utilizados para estudios de interacción de membranas porque tienen la capacidad de fusionarse con espermatozoides de casi todas las

especies de mamíferos testadas (Yanagimachi, 1988). Sin embargo existen referencias en las que se demuestra que los espermatozoides humanos no son capaces de fusionarse y penetrar ovocitos de ratón y rata, especies filogenéticamente cercanas al hámster (Quinn, 1979; Pavlok, 1980).

La capacidad de fusión de la membrana de ovocitos de hámster podría ser debida a características de naturaleza bioquímica de esta membrana (lípidos y proteínas). La promiscuidad de los ovocitos de hámster para fusionarse con espermatozoides de numerosas especies sugiere que este proceso podría ocurrir mediante un mecanismo que es único para los ovocitos de hámster y algunos estudios evidencian esto. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que inhibe la fusión de ovocitos de hámster con espermatozoides de cobaya, no tiene efecto en la fusión de ovocitos y espermatozoides de cobaya (Primakoff y Hyatt, 1986).

1.1.4.2. Moléculas implicadas en el proceso de unión y adhesión entre el espermatozoide y el ovocito

A nivel espermático, el primer hallazgo sobre las desintegrinas como moléculas implicadas en la adhesión al ovocito fue la proteína PH-30 o fertilina, reconocida por un anticuerpo monoclonal contra la membrana plasmática de hámster, y capaz de inhibir la fusión en un alto porcentaje (Green, 1993). El anticuerpo PH-30 inmunoprecipitaba una proteína formada por un heterodímero con dos subunidades, fertilina α (ADAM 1) y fertilina β (ADAM 2).

Estas dos subunidades se han identificado en diferentes especies de mamíferos, como el ratón, aunque algunas especies pueden no expresar la subunidad α de la fertilina. Según Jury y colaboradores (1997) los espermatozoides humanos no expresan una proteína fertilina α funcional, lo cual pone en duda su función propuesta en la fecundación. Estos autores cuestionan la existencia del complejo fertilina **a-b** en humanos, porque según sus resultados tampoco han sido capaces de identificarlo en macacos.

Mediante ensayos en los que se utilizaron secuencias de péptidos de la fertilina β de hámster (en concreto del dominio desintegrina), obtenidos mediante síntesis, se observó una importante reducción de la fusión entre espermatozoides y ovocitos (Myles y cols. 1994), por lo que se le ha atribuido una función en el mecanismo de fusión. Para profundizar en el estudio del mecanismo de unión y fusión de gametos se han obtenido ratones "knock-out" con ausencia de fertilina **b**, ADAM 3 o ambas. Los espermatozoides de cada una de las líneas de ratones mostraron una dramática reducción en la unión a ovocitos sin ZP, en torno al 90% (Cho y cols., 1998; Nishimura y cols., 2001). Sin embargo, se observó además que los ratones "knock-out" para fertilina **b** o ADAM 3, presentaban reducción en la expresión de otras desintegrinas y podría afectar a otras proteínas no identificadas y responsables de la unión del espermatozoide.

1.1.4.3. Moléculas implicadas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito

Solamente unas pocas proteínas espermáticas que son candidatas a tener un papel en la fusión espermatozoide-ovocito se han estudiado con detalle. Estudios en el ratón usando ensayos de inhibición con anticuerpos o de competición con péptidos y proteínas atribuyen un posible papel en la fusión a las proteínas DE (Cohen y cols., 2000) y "equatorina" (Toshimori K, 1998). Además, estos ensayos también indican que fertilina **b** y ADAM 3 son necesarias para la fusión, aunque cuando se utilizaron ratones "knockout" para estas dos moléculas se observó una ligera inhibición de la fusión (Cho y cols., 1998; Nishimura y cols., 2001). En cuanto al ovocito, la molécula CD9 es uno de los miembros de la familia de proteínas denominadas tetraspaninas, y se ha descrito que está involucrado en varios procesos celulares como infecciones virales en células de cánidos y félidos, fusión de células musculares, adhesión y motilidad celular (Loffler y cols., 1997).

La primera referencia que indica la implicación del CD9 en el proceso de fecundación fue obtenida de experimentos en los que usaban anticuerpos contra CD9 (Chen y cols., 1999), y como resultado se inhibía *in vitro* la unión y fusión del espermatozoide al ovocito de forma dosis dependiente. CD9 se encuentra distribuido por toda la superficie del ovocito, con la excepción de la región que cubre la placa metafásica en el caso de roedores y donde raramente se produce la fecundación (Kaji y cols., 2000). Kaji y cols., (2000), Le Naour y cols. (2000) y Miyado y cols. (2000) demostraron que los espermatozoides eran capaces de unirse a ovocitos de ratón deficientes en CD9 de modo similar al tipo salvaje, pero que sin embargo raramente se producía la fusión entre los gametos *in vivo* o *in vitro*. Además cuando se microinyectaron espermatozoides en los ovocitos deficientes en CD9 se consiguió desarrollo a término, demostrando que la deficiencia en CD9 no impedía el desarrollo normal de los cigotos (Miyado y cols. 2000).

El mecanismo de acción en el proceso de fusión del CD9 no se conoce completamente pero parece que actúa en colaboración con otras proteínas de superficie del oolema. Algunos estudios sugieren que el CD9 funciona a través de un gran pliegue o “bucle” (EC2) y que una secuencia determinada de aminoácidos a ese nivel interviene en la fusión (Zhu y Evans, 2002). Talbot y cols., (2003) afirman que además del CD9 como molécula esencial en este proceso, participa también una proteína específica anclada a GPI (glicosilfosfatidilinositol). A nivel espermático se ha descrito la existencia de una familia de proteínas denominadas “Izumo” que son responsables de la fusión del espermatozoide en ratón (Nioue y cols. 2005).

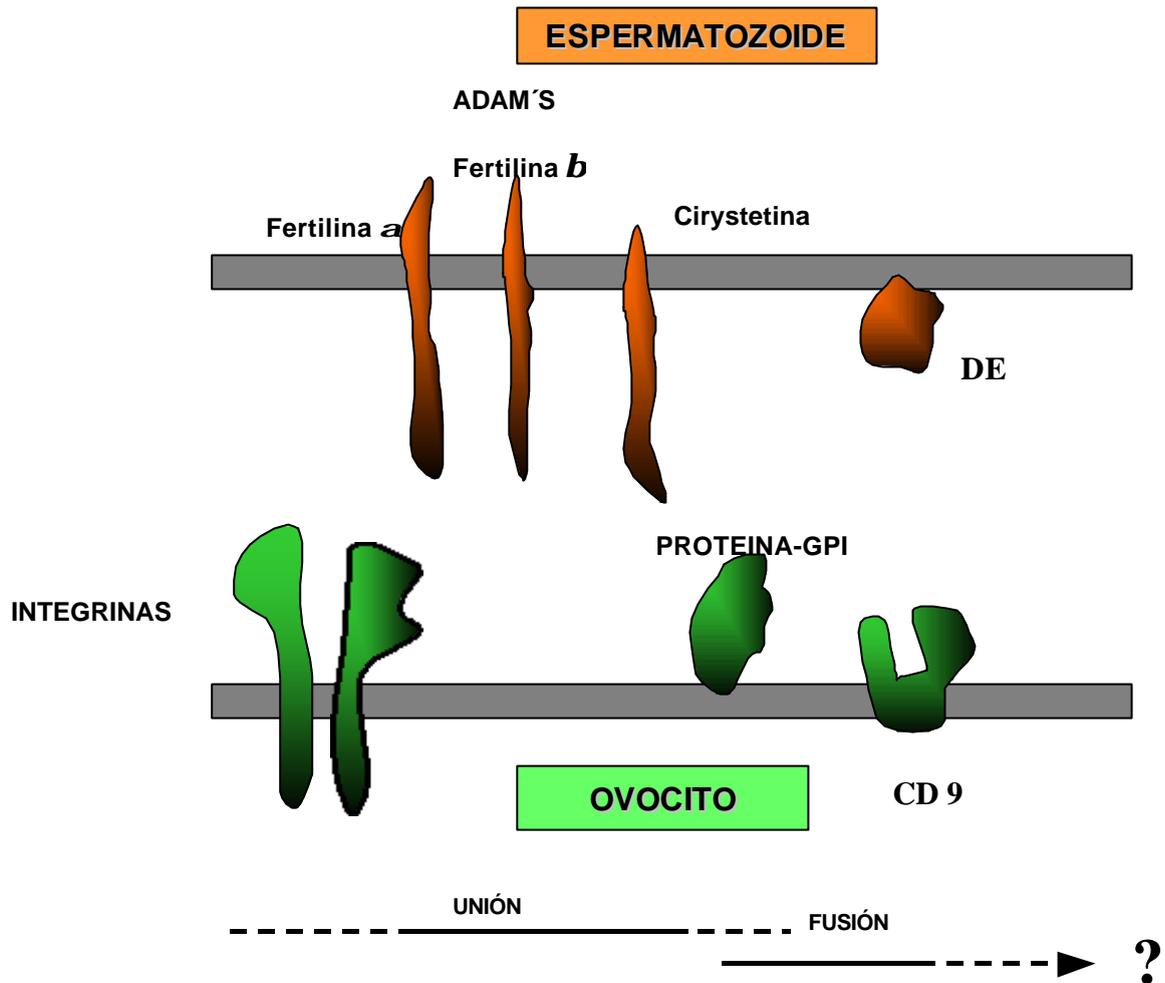


Figura 4. Representación de las moléculas implicadas en el proceso de unión y fusión espermatozoide-ovocito (Modificado de Kaji y Kudo, 2004).

En la **figura 4** se representan algunas de las moléculas implicadas en la unión y/o fusión de los espermatozoides al ovocito. A nivel del ovocito las integrinas parecen tener alguna función en la unión, actuando como receptores de las proteínas espermáticas tipo ADAM'S, mientras que en la fusión participa el CD9 en cooperación con proteínas-GPI. A nivel del espermatozoide, las proteínas del tipo ADAM'S participan en el proceso de unión, mientras que las implicadas en el proceso de fusión son proteínas tipo "Izumo" (Nioue y cols. 2005) y proteínas epididimales DE (Cohen y cols., 2000; Cuasnicu y cols., 2001).

1.1.5. Interacción con el citoplasma

Una vez que se produce la fusión entre ambos gametos, se desencadena la activación del ovocito (Yanagimachi, 1994). Dicha activación lleva como consecuencia la reanudación de la meiosis, la reacción cortical, la formación de los pronúcleos masculino y femenino y posteriormente la formación del embrión (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

Tras la penetración del espermatozoide en el ooplasma se produce la separación entre la cola y la cabeza. A continuación, la cromatina queda libre en el citoplasma del ovocito tras la pérdida de la envoltura nuclear del espermatozoide y sufre un proceso de descondensación mediante reducción de puentes disulfuro, gracias al glutatión reducido presente en el ooplasma (Yanagimachi, 1994). Esta descondensación se produce desde la región posterior de la cabeza hacia la región anterior (Terada y cols., 2000).

Respecto a la activación del ovocito se han propuesto dos modelos en los cuales participa activamente el espermatozoide: activación mediada por receptor y/o por factor espermático. En la activación mediada por receptor, la unión del espermatozoide mediante ligandos a receptores específicos del oolema produce una señal de transducción que activa la fosfolipasa C, y ésta interviene en la transformación del fosfoinositol bifosfato a inositol-fosfato y diacilglicerol, los cuales provocan la activación del ovocito.

El otro modelo de activación mediante factor espermático es el más aceptado actualmente (Willians, 2002). Tras la fusión entre el espermatozoide y el ovocito se libera en el ooplasma un componente espermático o factor activador del ovocito (factor citosólico), que reside en el segmento ecuatorial del acrosoma, y que es capaz de inducir los eventos iniciales de la cascada de activación. Este factor parece no ser estrictamente específico de especie, habiéndose observado la formación de pronúcleos masculinos en ovocitos de ratón (Wakayama y cols.,

1997), hámster (Yanagida y cols., 1991) y cerdo (Kim y cols., 1999) después de la microinyección de espermatozoides de especies heterólogas. Sin embargo, en el caso de espermatozoides de rata se ha observado que no son capaces de formar pronúcleos masculinos en ovocitos libres de ZP de cerdo (Zhao y cols. 2002), hámster o conejo (Hanada y Chang, 1976). Una posible explicación a estos resultados sería que los espermatozoides de rata tengan una cantidad insuficiente de factor activador o una baja capacidad activadora. Además, Okitsu y cols. (2001) tras la microinyección de espermatozoides de toro y hombre en ovocitos bovinos maduros observaron que los humanos producían unos porcentajes de activación significativamente menores (75.9 % vs. 14.8%). Estos resultados sugieren que existe diferente capacidad del espermatozoide según la especie para provocar la activación del ovocito.

Naish y cols. (1987) demostraron que los mecanismos empleados por los ovocitos de hámster para transformar el núcleo del espermatozoide en pronúcleo y la síntesis de ADN en el núcleo no son exclusivos para espermatozoides de hámster. No obstante, los mecanismos mencionados funcionan, aparentemente, de forma más efectiva cuando está presente un núcleo espermático de hámster que con núcleos espermáticos heterólogos.

Acorde con la bibliografía existente, parece no existir especificidad de especie en sentido estricto en las interacciones a este nivel, pudiendo provocarse la activación ovocitaria y formación de pronúcleos mediante la microinyección de espermatozoides heterólogos, en algunos casos.

Sin embargo, se observan diferencias en los porcentajes de activación de ovocitos según se utilicen espermatozoides homólogos o heterólogos. Esto implica que la ICSI heteróloga, con ovocitos y espermatozoides de determinadas especies, puede ser utilizada como herramienta para la investigación y desarrollo de pruebas que evalúan la capacidad de activación del ovocito, descondensación del espermatozoide y formación y aposición de pronúcleos; entrenamiento de técnicos que realizan ICSI o validación de nuevos protocolos. Sin embargo,

parece que existen algunas limitaciones en cuanto a las especies más adecuadas de ovocitos a utilizar en función de la procedencia de los espermatozoides.

Diferentes autores utilizando esta técnica de ICSI heteróloga han desarrollado pruebas de fertilidad que estudian la funcionalidad espermática (Terada y cols., 2004a), la función del centrosoma (Terada y cols., 2004b) o analizan los cromosomas de espermatozoides humanos procedentes de pacientes oligoastenozoospermicos (Ogawa y cols., 2000), utilizando ovocitos de conejo, vaca, hámster o ratón.

1.2. MODIFICACIONES EN LA ZP QUE AFECTAN A LA INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HOMÓLOGA

1.2.1. Polispermia

Se conoce como polispermia a la fecundación de un ovocito por más de un espermatozoide. Los ovocitos de la mayoría de mamíferos han desarrollado mecanismos para prevenir la polispermia durante su desarrollo y maduración (Ducibella, 1994; Yangagimachi, 1994).

Cuando se produce la polispermia, la poliploidía generada suele desencadenar en un embrión inviable y ha sido detectada en un 10-20% de los abortos espontáneos en la especie humana (Michelmann y cols. 1986). La mayoría de los embriones humanos triploides aparecen como resultado de una fecundación polispérmica con presencia de dos espermatozoides. A pesar de los mecanismos desarrollados para prevenir este fenómeno, se produce una incidencia entre el 1 y el 2 % de polispermia incluso cuando la fecundación se produce en las mejores condiciones en momentos cercanos al de la ovulación. Una gran variedad de factores puede contribuir al incremento en la frecuencia de la polispermia. Diferentes autores han revisado este proceso en porcino (Coy y Romar, 2002; Wang y cols. 2003). Entre los factores causantes de este proceso destacan diferentes causas estrechamente relacionadas con los procesos de

fecundación *in vitro*, como son el uso de ovocitos obtenidos por maduración *in vitro*, el uso de un alto número de espermatozoides capacitados por ovocito, anomalías a nivel de la ZP, inadecuada composición de los medios de FIV, o condiciones subóptimas de pH o temperatura durante la fecundación.

1.2.2. Bloqueo de la polispermia

En el momento de la fecundación, la polispermia es prevenida por modificaciones a nivel de dos estructuras del ovocito: la ZP y la membrana plasmática (Wang y cols., 2003; Gardner y cols. 2007).

El bloqueo de la polispermia a nivel de la cubierta del ovocito se ha estudiado ampliamente en animales mamíferos y no mamíferos. En equinodermos y anfibios anuros, la exocitosis de los gránulos conlleva la elevación de la cubierta vitelina de la membrana plasmática y la pérdida de la habilidad para unir espermatozoides (Wolf, 1974). El bloqueo a nivel de la ZP en los mamíferos es similar a este proceso, la exocitosis de los gránulos corticales conlleva modificaciones en la ZP que provocan que los espermatozoides no se puedan unir (Yanagimachi, 1994).

La importancia relativa de la ZP frente a la membrana plasmática varía según las especies (Yanagimachi, 1994). En la mayoría de mamíferos se cree que es la ZP la estructura más importante como responsable del bloqueo de la polispermia. Los mecanismos implicados son la reacción cortical y la reacción de zona. La reacción cortical se refiere a las modificaciones provocadas sobre el oolema como consecuencia de la exocitosis de los gránulos corticales al espacio perivitelino, debido a las oscilaciones de Ca^{2+} producidas durante la penetración (Miyazadi y cols., 1993), mientras que la reacción de zona se debe a las modificaciones provocadas sobre la ZP. Entre las enzimas identificadas, que varían según las especies, se encuentran la ovoperoxidasa, enzimas tipo tripsina, N-acetilglucosamina, activador del plasminógeno y otras (Hoodbhoy y Talbot, 1994; Miller y cols., 1993); recientemente nuestro equipo ha demostrado que los

residuos de ácido siálico de las cadenas de la ZP bovina están implicados en la unión de espermatozoides y que la presencia de un inhibidor de sialidasa en el medio de FIV incrementa la polispermia, sugiriendo la participación de la sialidasa en la especie bovina (Velasquez y cols., 2006); sin embargo, en la especie porcina no se ha detectado por el momento ningún enzima de los gránulos corticales que participe con seguridad en el bloqueo de la polispermia.

Estas enzimas provocan cambios en la ZP que son permanentes en condiciones fisiológicas y evitan que los ovocitos fecundados expuestos nuevamente a espermatozoides capacitados puedan ser penetrados (Barros y Yangimachi, 1971). El fallo de estos mecanismos trae como consecuencia la aparición de polispermia. Por lo tanto el ovocito, el espermatozoide y las condiciones de inseminación son considerados como responsables de la aparición de la polispermia.

Sin embargo, a nivel del oolema el bloqueo difiere significativamente entre mamíferos y no mamíferos. En este último grupo (erizo de mar y ranas como los más estudiados) el bloqueo de la membrana implica una rápida y transitoria despolarización del potencial del oolema de modo que no se favorece la penetración del espermatozoide, aunque no se inhibe completamente (Jaffe y Cross, 1984). Esta despolarización post-fecundación ocurre desde unos pocos segundos tras la fecundación (por esto se denomina también bloqueo rápido) hasta varios minutos después. Sin embargo, no se ha observado una despolarización de membrana significativa en los ovocitos mamíferos más estudiados como ratón, hámster o conejo. Además, también es de destacar que el bloqueo del oolema en mamíferos se establece aproximadamente a la misma vez que el bloqueo de la ZP, entre 0'5 y 1 horas post-fecundación. Esto hace que en mamíferos los bloqueos se distingan por ocurrir en diferentes lugares (oolema y ZP), mientras que en no mamíferos se distinguen, además de por ocurrir en diferente lugar, por hacerlo en diferente momento tras la fecundación (rápido o lento; revisado por Gardner y Evans, 2006).

Aunque no se conoce demasiado sobre las moléculas y mecanismos básicos del bloqueo del oolema en mamíferos, hay evidencias de su existencia a partir de varios resultados obtenidos desde hace décadas. Por ejemplo, la presencia de espermatozoides en el espacio perivitelino (EPV, entre la ZP y la membrana plasmática) que son incapaces de fecundar el ovocito, descrita por Lewis y Wright (1935) y por Austin (1961).

Tras la inseminación *in vitro*, los ovocitos de algunas especies como conejo, topo o determinadas especies de roedores (*Ochotona princeps*, *Geomys bursarius*) presentan entre decenas o centenares de espermatozoides en el EPV, lo que sugiere que deben disponer de un sistema muy efectivo de bloqueo a este nivel y poco eficaz a nivel de la ZP. En el resto de especies, entre las que se incluye ratón, humano, rata, hámster, gato o cerdo, en los ovocitos es frecuente encontrar un reducido número de espermatozoides (1-10) en el EPV, sugiriendo que la función de bloqueo se establece a los dos niveles: ZP y oolema (Hunter, 1990).

En base a la información revisada, queda patente que los mecanismos implicados en el bloqueo de la polispermia, en primer lugar pueden actuar a nivel de la ZP y del oolema; en segundo lugar demuestran una gran complejidad por lo que aún no se conocen todas las moléculas y mecanismos implicados y, por último, presentan notables diferencias según las especies, lo cual conlleva que el conocimiento generado sobre unas pocas especies, normalmente roedores que son los más utilizados en laboratorio, no siempre se puede hacer extensible al resto de especies.

In vitro, la especie porcina es una de las especies en que la aparición de la polispermia es más frecuente. A menudo el porcentaje de polispermia puede superar el 50 % (Coy y cols., 2002), incluso con cortos periodos de incubación espermatozoide-ovocito (Funahashi y Romar, 2004). En rumiantes, aunque es menos frecuente, nuestras observaciones en laboratorio y algunos trabajos

publicados demuestran que también se produce polispermia, en porcentajes entre el 10 y el 25 % (Wang y cols., 1997; Coy y cols., 2005). Por ello es de gran interés profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en el mecanismo de bloqueo de la polispermia en estas especies, con el fin de disminuirla y que ello repercuta en un mayor rendimiento de la producción de embriones *in vitro*.

1.2.3. Mecanismos implicados en el bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP

Entre los mecanismos responsables del bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP se encuentran la proteólisis, la deglicosilación enzimática y la formación de puentes disulfuro.

La función proteolítica del contenido de los gránulos corticales podría ser responsable en parte del bloqueo de la polispermia y disminución de la unión de espermatozoides a la ZP tras la reacción de zona (Benoff, 1997). Según los resultados obtenidos en algunas especies objeto de estudio como ratón, vaca, cerdo y humano la proteólisis afecta a la glicoproteína ZPA (ZP2) (Moller y Wassarman, 1989; Ducibella y cols., 1995; Benoff, 1997; Nakano y Yonezawa, 2001). En ratón se ha observado que ZP2 (120 kDa) es transformada en dos fragmentos de 90 y 30 kDa debido a la proteólisis producida entre el aminoácido Alanina 167 y Aspártico 168. El lugar de corte de ZPA ha sido igualmente identificado en el cerdo, vaca y *Xenopus laevis*. En la vaca, la glicoproteína ZPA parcialmente deglicosilada con un peso molecular de 72 kDa se rompe en dos polipéptidos de 63 y 21 kDa respectivamente unidos por un puente disulfuro (Noguchi y cols., 1994).

Algunos autores han relacionado esta proteólisis con cambios en la estructura tridimensional de la ZP y por lo tanto el endurecimiento de la ZP observado tras la fecundación (Benoff, 1997; Green, 1997). Sin embargo, los datos publicados por Dean (2004) implican a la proteólisis en la inhibición de la unión del espermatozoide y no en el endurecimiento de la ZP.

Otro de los mecanismos propuestos que participa en el bloqueo efectivo de la polispermia en condiciones fisiológicas es la deglicosilación enzimática, es decir la eliminación de terminales glicosídicos de la ZP que podrían intervenir como receptores para la unión del espermatozoide.

Entre los azúcares propuestos como candidatos a ser receptores a nivel de la ZP y objeto de la acción de estas glicosidasas existen diferencias según las especies. Mientras que en el ratón existen evidencias que demuestran que las cadenas de glúcidos O-unidas presentes en ZP3 tienen un importante papel en la unión de gametos (Florman y Wassarman, 1985; Miller y cols., 1992), en otras especies como bovino y porcino existen evidencias del papel desempeñado por las cadenas glucídicas del tipo N-unidas presentes a nivel de ZPB (ZP4) (Amari y cols., 2001; Yonezawa y cols., 2001; Yurewicz y cols., 1998; Nakano y Yonezawa, 2001).

Diferentes carbohidratos situados en posición terminal, han sido propuestos incluso en la misma especie como implicados en la unión a la ZP, como en el caso del ratón con Fucosa, Manosa, α -Gal y GlcNAc (Benoff, 1997), lo cual demuestra la controversia que existe sobre la molécula responsable del reconocimiento primario. En bovino, la presencia de residuos de manosa en las cadenas N-unidas ha sido identificada como responsable en este proceso (Amari y cols., 2001), aunque recientemente ha sido demostrado que el ácido siálico es también responsable de este proceso de unión (Velásquez y cols., 2006) existiendo en la actualidad, al igual que en la especie murina, dos azúcares implicados al parecer con diferentes afinidades. En la especie porcina (Mori y cols., 2000) también se ha demostrado la función del ácido siálico en la unión primaria del espermatozoide a la ZP.

A pesar de que clásicamente la función de deglicosilación enzimática sobre estos residuos glucídicos se le ha atribuido a los enzimas presentes en los gránulos corticales, su origen puede ser triple: los gránulos corticales mencionados, el acrosoma y el fluido oviductal, tres ubicaciones en las que está

demostrada la existencia de glicosidasas (Miller y cols. 1993; Carrasco y cols., 2007; Romar y cols. 2007).

En relación a las posibles enzimas contenidas en los gránulos corticales que actúan a este nivel, en ratón se ha descrito la presencia de una hexosaminidasa que actúa sobre los residuos de N-acetil-glucosamina (Miller y cols., 1992; 1993). Recientemente, Velasquez y cols., (2006) han propuesto la existencia de una enzima neuraminidasa (sialidasa) en los gránulos corticales de ovocitos de vaca, que sería responsable de la eliminación de residuos de ácido siálico presentes a nivel de la ZP, tras la fecundación. Aunque no se obtienen evidencias directas de la presencia de este enzima, la adición de un inhibidor de neuraminidasa al medio de fecundación, provoca un aumento considerable del número de espermatozoides unidos a ZP en ensayos de unión a zona y un aumento significativo del número medio de espermatozoides por ovocito en fecundación.

Para comprobar la existencia de las modificaciones causadas por la deglicosilación, el análisis de ZP3 obtenida de embriones de ratón de dos células demuestra que ha perdido su actividad biológica, no siendo ya capaz de unir espermatozoides ni de inducir la RA (Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1994), no observándose diferencias que se puedan detectar mediante análisis bioquímicos usando electroforesis en la glicoproteína ZP3 de ratón antes y tras la fecundación. Diferentes investigadores han sugerido que esta modificación en la ZP3 podría ser debida a un cambio en los oligosacáridos que componen esta glicoproteína como consecuencia de la acción de las exoglicosidasas. (Miller y cols., 1992; 1993; Benoff, 1997). Avilés y colaboradores (1997) estudiaron la composición de la ZP de ratón en ovocitos fecundados y no fecundados, mediante tinción con lectinas y observaron distintos patrones, que demuestran diferencias en la composición entre la parte interna y externa de la ZP, lo cual justifica porque los espermatozoides no se unen a ambas superficies de la ZP de igual modo.

En relación a la formación de puentes disulfuro se ha observado que en la ZP, después de la fecundación o la activación *in vitro*, se produce un cambio en la sensibilidad frente a diferentes agentes como enzimas proteolíticos, calor, ácidos y agentes reductores (Dunbar y Wolgemuth, 1984). Estas modificaciones, a menudo denominadas endurecimiento (“hardening”), que normalmente implican un mayor tiempo necesario para la solubilización de la ZP, estarían relacionadas con el bloqueo de la polispermia y/o con la protección del embrión durante su paso por el oviducto (Hoodbhoy y Talbot, 1994).

Iwamoto y cols. (1999) describieron en la especie bovina un incremento en el número de puentes disulfuro tras la fecundación. Estos autores sugieren que esta formación de nuevos puentes disulfuro junto con una proteólisis específica resulta en la construcción de una estructura de la ZP más rígida.

En el erizo de mar se ha descrito la existencia de una peroxidasa, denominada ovoperoxidasa, la cual se libera de los ovocitos durante la fecundación y es responsable de la formación de puentes ditirosina, que provocan el endurecimiento de la membrana vitelina (estructura equivalente a la ZP de mamíferos) cuya finalidad sería prevenir la entrada de espermatozoides adicionales, tras la fecundación. Además entre los efectos de la peroxidasa se encuentra el de ser espermicida, por lo que otro mecanismo sería disminuir la viabilidad de los espermatozoides cercanos al ovocito tras la fecundación (Foerder y Shapiro, 1977).

1.2.4. Efecto de las células y secreciones oviductales

Diferentes autores han propuesto que las células oviductales y células del *cumulus oophorus* ejercen efectos sobre la ZP. Broermann y cols. (1989) observaron que los ovocitos que habían estado en contacto con las secreciones oviductales necesitaban largos periodos de tiempo, más de 24 horas, para la disolución de la ZP. Además la preincubación de ovocitos con glicoproteínas

purificadas de oviducto (Kouba y cols., 2000) y con células oviductales (Romar y cols., 2001) aumenta la monospermia tras la fecundación.

Bajo condiciones *in vitro*, en las que los ovocitos no han estado en contacto con las secreciones oviductales, la reacción cortical de ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro* aparece de forma tardía en el tiempo (Wang y cols. 1997). Coy y cols. (2002) sugieren que tras la fecundación *in vitro* podría no producirse el endurecimiento de la ZP y Romar y cols. (2005) proponen que la falta de endurecimiento de la ZP después de la FIV podría ser una de las explicaciones a los altos porcentajes de polispermia observados en los sistemas *in vitro*.

Wang y cols. (2003), a la vista de los efectos observados, sugieren que algunas glicoproteínas del fluido oviductal podría entrar al espacio perivitelino o a la membrana plasmática para facilitar la sincronización de la exocitosis de los gránulos corticales y promover la reacción de zona. Recientemente, el grupo del Dr. Prather (Hao y cols., 2006) ha demostrado la presencia de una proteína de la matriz extracelular, denominada osteopontina, en el oviducto de cerdas entre los días 0 y 5 del ciclo estral, tanto en hembras gestantes como no gestantes, cuyo efecto provoca una reducción de la polispermia y un aumento del rendimiento durante la fecundación *in vitro*. Utilizando una concentración determinada de osteopontina observan también un aumento del tiempo de digestión de la ZP con pronasa. Sin embargo, el mecanismo a través del cual ejerce su efecto la osteopontina no ha sido descrito.

Mc Cauley y cols. (2003) demostraron que la adición exógena de glicoproteínas específicas de oviducto provocaba una mejora en el porcentaje de ovocitos monospermicos. Además el número de espermatozoides unidos a la ZP fue significativamente menor. Una posible explicación que proponen los autores para la reducción de la polispermia obtenida es que las glicoproteínas se unan a la ZP y formen una barrera física que impida la unión del espermatozoide o modifiquen los sitios de unión del espermatozoide. Sin embargo, a pesar de que

los resultados son claros, no hay ninguna demostración del mecanismo de acción implicado en la reducción de la polispermia observada, siendo tan sólo hipótesis o sugerencias de los autores para explicar dichos resultados.

1.2.5. El problema de la polispermia en las especies porcina y bovina

La producción *in vitro* de embriones es una herramienta de gran utilidad para técnicas de investigación en áreas como la transgénesis, xenotransplantes, mejora genética o recuperación de especies en peligro de extinción (Coy y Romar, 2002) y para la producción de animales de granja, sobre todo cuando se usa junto a la tecnología del semen sexado (Wheeler y cols., 2006). A pesar de los avances alcanzados en los últimos 30 años, el rendimiento y calidad de los embriones obtenidos *in vitro* es menor en comparación con los embriones obtenidos *in vivo* (Hyttel y cols., 2000).

En la especie porcina, desde 1985 cuando Cheng publicó por primera vez la obtención de lechones mediante fecundación *in vitro* y tras el primer nacimiento de lechones utilizando ovocitos madurados y fecundados *in vitro* en el año 1993 (Yoshida y cols.), numerosos grupos de investigación han centrado su trabajo en el estudio de la producción *in vitro* de embriones en esta especie, intentado buscar soluciones a los problemas planteados (limitado desarrollo de los embriones para alcanzar el estadio de blastocisto y menor calidad en comparación con los embriones obtenidos *in vivo*) (Hunter, 1990; Wang y cols., 1998 ; Prather y Day, 1998; Abeydeera, 2002; Coy y Romar, 2002; Niemann y cols., 2003; Funahashi, 2003; Nagai y cols., 2006).

La baja calidad de los embriones no es atribuida a un fallo puntual en el sistema de producción *in vitro*, sino a una combinación de determinados factores como: inadecuada o incompleta maduración citoplasmática, inadecuada formulación de los medios de cultivo y unas condiciones de cultivo subóptimas. Sin embargo entre las causas destaca el elevado porcentaje de polispermia, que como se ha indicado anteriormente presenta de forma frecuente porcentajes que

pueden superar el 50 % (Funahashi y Romar, 2004). En bovino, aunque es menos frecuente, nuestras observaciones en laboratorio y algunos trabajos publicados demuestran que también se produce polispermia, en porcentajes entre el 10 y el 25 % (Wang y cols., 1997; Coy y cols., 2005a).

Con la finalidad de disminuir los porcentajes de polispermia y obtener mejoras en la calidad de los embriones porcinos, diferentes sistemas de FIV han sido ensayados como: el cocultivo de espermatozoides con células oviductales (Romar y cols., 2001), con fluido oviductal (Kim y cols., 1996), o con fluido folicular (Funahashi y Day, 1993). Además se han utilizado sistemas de fecundación, como el descrito por Li y cols. (2003) que utiliza pajuelas de criopreservación de embriones que mimetizan las condiciones físicas en que se produce la fecundación *in vivo*, aunque no han conseguido dar una solución definitiva al problema.

Recientemente, Hao y cols. (2006) han conseguido disminuir el porcentaje de polispermia en la fecundación porcina y aumentar hasta el 45% el rendimiento (porcentaje de ovocitos fecundados monospermicos sobre el total de los inseminados), mediante el uso de una sustancia denominada osteopontina, una proteína extracelular cuya presencia, entre otras, ha sido descrita en oviducto a nivel del istmo, y en las secreciones oviductales. Dicha sustancia ha demostrado también provocar un efecto sobre la ZP, aumentando el tiempo de digestión con pronasa y sobre los espermatozoides, disminuyendo su viabilidad y el porcentaje de RA de los espermatozoides unidos a la ZP, después de 6 horas de coincubación. Sin embargo, su efecto sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos fecundados hasta el estado de blastocisto y la calidad de los embriones, no ha sido estudiado.

A pesar de los avances conseguidos, hoy día no existe un sistema de FIV porcina que permita obtener resultados totalmente satisfactorios, con valores de polispermia próximos a los existentes en la fecundación *in vivo* (menos del 5%, Hunter, 1991) o al menos, cercanos a los porcentajes de polispermia obtenidos

utilizando ovocitos madurados *in vivo*, que se sitúan alrededor del 28% (Wang y cols., 1998).

Sin embargo, las mejoras conseguidas en el rendimiento de la FIV porcina anteriormente mencionadas (utilizando medios condicionados por células oviductales, adición de fluido oviductal o fluido folicular, coincubación de espermatozoides u ovocitos con células oviductales, glicoproteínas específicas de oviducto u osteopontina) sugieren la existencia de un factor desconocido de origen oviductal, el cual podría unirse a ovocitos y/o espermatozoides y disminuir de forma efectiva los porcentajes de polispermia en la fecundación *in vitro* porcina. Este factor no ha sido identificado hasta el momento.

1.3. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HETEROLÓGA COMO MODELO PARA EL DESARROLLO DE PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

1.3.1. Antecedentes y situación actual.

La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido el objetivo de numerosos científicos a lo largo de los siglos. Dicha capacidad de fecundación es el resultado de la habilidad del gameto masculino para que se produzca la capacitación, atravesar la ZP, unirse a la membrana plasmática, fusionarse con ella y finalmente penetrar en el citoplasma y formar el pronúcleo masculino.

Con el fin de estudiar la capacidad fecundante de los espermatozoides en las especies animales o en el hombre, se han realizado numerosos estudios buscando los parámetros que muestren una mayor correlación con la fertilidad y permitan discriminar entre muestras de semen de alta y baja fertilidad. En 1929, Macomber y Sanders propusieron que la concentración espermática podía ser útil para diferenciar varones fértiles e infértiles. Este criterio permanece como un criterio útil, aunque con numerosas limitaciones, hasta nuestros días. Desde

entonces diferentes investigadores han intentado desarrollar métodos que identifiquen alteraciones en la funcionalidad espermática. Sin embargo, desafortunadamente hoy día no existe una prueba fiable al 100% que permita identificar cualquier tipo de alteración en la función del espermatozoide y predecir con exactitud los resultados de fecundación *in vivo* y/o *in vitro*.

Los análisis seminales convencionales incluyen determinación de la concentración espermática, estudios de la motilidad y morfología, y a pesar de ser ampliamente usados, sus resultados no proporcionan un diagnóstico o pronóstico preciso, tal y como se ha demostrado en un estudio a gran escala que incluía a más de 1400 parejas (fértil e infértil), realizado por Guzick y colaboradores (2001). Una excepción a esta regla serían los casos extremos, donde el recuento del número de espermatozoides es extremadamente bajo, y la mayoría de células son inmóviles o presentan defectos morfológicos.

En vista de las limitaciones que nos plantea la biología en este quehacer, se ha optado por desarrollar pruebas que evalúan la funcionalidad del espermatozoide y su habilidad para interactuar con el ovocito a diferentes niveles. El ensayo de funcionalidad espermática ideal debería permitirnos evaluar de forma secuenciada: el estado de maduración y capacitación del espermatozoide, la interacción con el tracto reproductor femenino, la capacidad de interacción con las envolturas del ovocito y con el ooplasma, la activación del ovocito y su contribución al desarrollo temprano del embrión (Fraser, 1995; Aitken, 1997; Oehninger y cols., 2000).

Obviamente no existe una prueba que permita evaluar de forma conjunta todas estas propiedades. Por ello, el análisis secuencial de los principales procesos o eventos que son críticos en la fecundación mediante una combinación de pruebas, puede ser de gran utilidad a nivel clínico para la predicción de la capacidad fecundante (Oehninger y cols, 2000).

Existen distintos tipos de estudios que tienen como objetivo predecir la fertilidad masculina, los cuales se pueden dividir en grandes grupos, siguiendo diferentes criterios. Por ejemplo según sean análisis básicos u opcionales, según evalúen características físicas y bioquímicas del semen o características funcionales.

1.3.2. Estudio de las características físicas y bioquímicas del semen

Con la intención de estandarizar los procedimientos y criterios para la evaluación del semen humano la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*) publicó en 1980 la primera edición del “Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction”. Desde entonces se han publicado ya tres ediciones posteriores (1987, 1992 y 1999) con la finalidad de ir actualizando esos criterios e incluir los avances conseguidos.

En dicho manual, los procedimientos de evaluación del semen se dividen en tres grupos: a) los considerados básicos para la evaluación del semen donde se incluye una primera evaluación macroscópica (color, pH, volumen, viscosidad, aglutinación, etc) y microscópica del semen (concentración, motilidad, morfología); b) los que se consideran opcionales pero con valor diagnóstico en clínica (test hiposmótico, ensayos bioquímicos de las secreciones de las glándulas accesorias, análisis espermático con sistemas CASA “computer assisted sperm analysis” o el test de hámster con ovocitos libres de ZP); c) en tercer lugar los que evalúan la capacidad funcional del espermatozoide y los basados en análisis de imagen para evaluación de la morfología espermática.

Sin embargo, se considera que esta clasificación está enfocada a una evaluación limitada, sencilla a nivel práctico, pero que puede ser incompleta. Por ello se revisan otras pruebas no mencionadas en el manual citado, pero que también son de interés y se agrupan según las características del semen que evalúan.

A nivel bioquímico, la evaluación del semen se refleja en el estudio de los productos de secreción de las glándulas accesorias. Entre los parámetros que se cuantifican destaca la medición de la fructosa, como indicador de la función de las vesículas seminales. También se ha demostrado que los niveles de L-carnitina y zinc son significativamente menores en plasma seminal de varones infértiles que en el de varones fértiles (WHO, 1999). Otros ensayos de interés son los que determinan la acrosina o el contenido de ATP.

1.3.3. Estudio de las características funcionales del semen.

Con relación a los ensayos no convencionales que evalúan la capacidad funcional del espermatozoide se pueden agrupar en tres tipos de ensayos: los que evalúan defectos de la función del espermatozoide, de forma indirecta mediante pruebas bioquímicas; los bioensayos de interacción de gametos entre si o con otras barreras fisiológicas (moco cervical) y el análisis de las características de movimiento de los espermatozoides mediante sistemas de análisis de imagen CASA.

1.3.3.1. Pruebas bioquímicas para analizar la funcionalidad espermática.

En el primer grupo de ensayos mencionado (los que evalúan defectos de la función del espermatozoide de forma indirecta mediante pruebas bioquímicas) se incluirían aquellos cuyo objetivo es medir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, "reactive oxygen species"), evidencias del daño oxidativo, o medición de la condensación y fragmentación de la cromatina.

El espermatozoide aporta la mitad de los cromosomas a la descendencia, por lo que un ADN anormal puede conllevar alteraciones en el proceso de la fecundación o en la calidad de los embriones. A pesar de que el ADN del espermatozoide es muy estable gracias a su organización característica (Agarwal y Said, 2003), existen diferentes causas que pueden provocar lesiones en el ADN

como fármacos, elevada temperatura testicular, contaminación atmosférica, edad avanzada, tabaquismo, y diversas enfermedades (revisado por Agarwal y Allamaneni, 2005). Esto ha generado el desarrollo de distintas técnicas que permiten detectar la presencia de lesiones en el ADN de los espermatozoides.

En relación a las especies reactivas de oxígeno se sabe que son generadas por el metabolismo celular y son consideradas dañinas cuando aparecen en gran cantidad. Sin embargo a muy bajas concentraciones, participan en la regulación de algunas funciones celulares, como la capacitación (Griveau y cols., 1994) y la RA (Griveau y cols., 1995), a pesar que los espermatozoides son altamente susceptibles al daño provocado por ROS, lo cual se debe al alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados presentes en la membrana plasmática y la baja concentración de enzimas para neutralizar ROS disponibles a nivel del citoplasma (Aitken y cols., 1989).

Tanto los espermatozoides como el plasma seminal poseen sistemas antioxidantes capaces de contrarrestar los daños provocados por ROS. Sin embargo estos sistemas parecen no funcionar adecuadamente en pacientes con problemas de infertilidad, donde se detecta una menor capacidad antioxidante total (Smith y cols., 1996; Lewis y cols., 1997). De hecho entre un 25 y un 40% de los pacientes con problemas de infertilidad muestran altos niveles de ROS (de Lamirande y Gagnon, 1995).

Se ha demostrado que el éxito de gestación natural está negativamente correlacionado con los niveles de generación de ROS, aproximadamente en el 50% de los pacientes oligozoospermicos que manifiestan un aumento de la producción de ROS (Aitken y cols., 1991).

La medición de las especies reactivas de oxígenos es extremadamente difícil debido al corto periodo de tiempo que permanecen estas moléculas como tales. Para la cuantificación de los niveles de ROS en células se han utilizado diferentes métodos como resonancia magnética de electrones, técnicas de

quimioluminiscencia y de citometría de flujo. Aunque comúnmente se han utilizado los ensayos de quimioluminiscencia (Sikka, 2004), debido a los altos costos que requieren las técnicas de resonancia magnética de electrones, actualmente las técnicas de citometría de flujo ofrecen una alternativa que permite obtener resultados satisfactorios (Gadea y cols., 2005) a un menor coste, haciendo más accesible su uso.

La citometría de flujo ha sido usada para medidas de estrés oxidativo en varios tipos de células. Este método mide la intensidad de fluorescencia de los derivados oxidados que se producen como consecuencia de la generación de ROS. Entre las sustancias utilizadas figuran dihidrorodamina 123 y 2',7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Esta última sustancia sufre deacetilación debido a las esterasas intracelulares, dando lugar a un componente no fluorescente DCFH, el cual es atrapado en el interior de las células. Sin embargo su oxidación por ROS produce DCF (2',7'-diclorofluoresceína) el cual es altamente fluorescente. La cuantificación de la fluorescencia y la duración de la misma permite el cálculo de ROS generados.

El daño de peroxidación provocado por los altos niveles de ROS se asocia tanto con una pérdida de la funcionalidad de la membrana, como con daños a nivel del ADN espermático.

En 1980, Evenson y colaboradores describieron el ensayo denominado SCSA ("sperm chromatin structure assay") basado en el estudio de la estructura de la cromatina espermática. Dicho ensayo se basa en la mayor susceptibilidad *in situ* del ADN a desnaturalizarse parcialmente, como consecuencia de un tratamiento con calor o con ácido. Para medir el grado de desnaturalización utiliza las propiedades metacromáticas de un colorante fluorescente, naranja de acridina, el cual tras unirse al ADN emite un color verde fluorescente (si el ADN presenta una estructura de doble hélice), o rojo fluorescente (si el ADN al que se

ha unido está desnaturalizado y se trata de una cadena simple). Para medir las emisiones generadas con diferente color se utiliza la citometría de flujo. Actualmente el estudio de la estructura de la cromatina del espermatozoide, conocido como SCSA es frecuentemente usado en clínicas de infertilidad humana (Bungum y cols., 2004) y también se ha demostrado su utilidad en el análisis seminal de especies domésticas como el cerdo (Evenson y cols., 1994) y el toro (Ballachey y cols., 1988). En la especie humana, estudios realizados demostraron que índices de fragmentación del ADN superiores al 27 % (Larson y cols., 2000) o al 30% (Evenson y cols., 1999) estaban relacionados con infertilidad o subinfertilidad. Gandini y cols., (2004) proponen que el estudio de la integridad de ADN puede tener mayor relevancia cuando se trata de correlación con resultados de fecundación natural o FIV convencional, mientras que no existen evidencias tan claras en cuanto a las correlaciones con los resultados de ICSI.

Otro ensayo que permite detectar anomalías del ADN es el ensayo TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-Nick End Labeling”). Este ensayo se base en el principio de que la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) incorpora dUTP en roturas de cadenas dobles o simples del ADN, utilizando en el ensayo desoxiuridina biotinilada, actuando como señal la biotina, la cual se puede detectar, por ejemplo, a través de técnicas de fluorescencia o quimioluminiscencia. Cuanto mayor número de roturas presente el ADN mayor será la señal resultante debido a un mayor número de moléculas incorporadas. Se ha demostrado una correlación inversa entre el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado y la motilidad, concentración y morfología, habiéndose utilizado como predictor del éxito en técnicas de reproducción asistida (Sun y cols., 1997).

Además, se han desarrollado otros ensayos que detectan anomalías en el ADN espermático como el ensayo de “*in situ* nick translation (NT)” (Agarwal y Allamaneni, 2005), el test de naranja de acridina (Hoshi y cols., 1996), o el ensayo *Comet*, que consiste en la electroforesis de células únicas para análisis del ADN, introducido por Ostling y Johanson en 1984 y que debe su nombre a la

imagen generada por el ADN del espermatozoide tras descondensarse en un gel y someterse a la acción de un campo eléctrico.

1.3.3.2. Bioensayos de interacción de gametos

En este grupo se incluyen los ensayos que estudian el comportamiento de los espermatozoides frente a las barreras que deben superar en condiciones fisiológicas, durante el proceso de fecundación. Con esta finalidad, se utilizan los ensayos que evalúan la capacidad de penetración del espermatozoide a través del moco cervical (interacción espermatozoide-moco cervical), los que estudian la unión e interacción del espermatozoide con la ZP, penetración heteróloga de ovocitos libres de ZP, medidas de la inducción de la RA, capacidad de activación del ovocito y descondensación espermática tras la microinyección espermática, y los más completos de todos, los ensayos de fecundación *in vitro* que evalúan la mayoría de los procesos implicados.

En la especie humana, se ha demostrado que la mayoría de ensayos que proporcionan un alto valor de predicción de la capacidad fecundante del espermatozoide corresponden a ensayos de interacción de gametos (Oehninger y colaboradores, 2000).

1.3.3.2.1. Ensayo de penetración del moco cervical

Fisiológicamente, el moco cervical es la primera barrera que los espermatozoides encuentran en el tracto genital femenino en su recorrido hasta alcanzar el ovocito. Por ello, la capacidad de penetración a través del moco cervical, bien sea *in vivo* (prueba postcoital) o *in vitro* (prueba de Dremer, prueba de Miller-Kurzrok o utilizando moco-semen cruzados) es una de las pruebas funcionales utilizadas para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides. La penetración de espermatozoides a través del moco cervical humano *in vitro* (MCH) ha demostrado que proporciona una importante predicción sobre la función espermática (Barrat y cols., 1989). Sharara y cols., (1995)

observaron correlación entre la penetración del moco cervical (humano y bovino) y los resultados de gestación.

Sin embargo debido a los problemas asociados con el MCH como son la disponibilidad de cantidades muy limitadas y las dificultades en la recogida junto con su inestabilidad en el almacenamiento, su uso ha sido muy limitado y algunos medios alternativos como la metilcelulosa están siendo empleados como alternativa (Ivic y cols., 2002).

Tras la penetración de la barrera cervical, el espermatozoide entra en la cavidad uterina donde se inicia el proceso de capacitación. Una de las consecuencias de este proceso es la hiperactivación, que consiste en un aumento de la velocidad del espermatozoide, con gran amplitud del desplazamiento de la cabeza y ondas flagelares asimétricas, describiendo un patrón de movimiento no progresivo que se puede detectar mediante sistemas de análisis de imagen tipo CASA (Quill y cols. 2003; Aitken, 2006).

1.3.3.2.2. Inducción y evaluación de la RA.

El estudio del estatus acrosomal es considerado un importante parámetro para evaluar el potencial de fertilidad masculina durante los tratamientos de reproducción asistida.

En contra de las opiniones de hace algunos años, que señalaban que la frecuencia de RA en poblaciones de espermatozoides capacitados se correlacionaba con el potencial fecundante, ahora está claro que la RA debe estudiarse a lo largo del tiempo para conocer ese potencial (Tesarik, 1989). Para ello es necesario disponer de técnicas que permitan visualizar y determinar el estado del acrosoma con gran exactitud, visualizando un alto número de células.

El mejor método para detectar espermatozoides con el acrosoma reaccionado es el microscopio electrónico, sin embargo requiere equipos costosos

y personal muy entrenado, por lo cual no puede ser utilizado de forma rutinaria. Otra técnica empleada es la microscopía de campo claro, desarrollada por Talbot y Chacon (1981), que continúa en uso por su simplicidad y bajo coste, a pesar de que la identificación exacta de los espermatozoides con acrosoma reaccionado es muchas veces difícil con este método.

Las técnicas de microscopía de fluorescencia hacen uso de una amplia variedad de moléculas marcadas con fluorescencia (lectinas, anticuerpos) con especificidad para unirse a estructuras del acrosoma y que permiten la identificación de espermatozoides reaccionados, discriminando incluso entre diferentes estados de la RA (Amin y cols., 1996).

La tinción fluorescente con chlortetraciclina (CTC) ha sido otra de las técnicas utilizadas (Lee y cols., 1987; Fraser y cols., 1995; Fraser, 1998). Sin embargo, existe un alto grado de subjetividad, por lo que ha generado numerosas críticas en cuanto a su utilidad.

Actualmente la citometría de flujo es una de las técnicas más utilizadas que permite medir la fluorescencia de gran número de células en un corto periodo de tiempo, con gran exactitud y sensibilidad aunque el coste de los equipos que se necesitan es alto.

Entre las moléculas conjugadas a sustancias fluorescentes que son empleadas tanto en citometría como en microscopía (Fénichel y cols., 1989; Henley y cols., 1994), se incluyen anticuerpos monoclonales (Cross, 1995) como el CD46 que se une a la membrana acrosomal interna (D´Cruz y Haas, 1993) y lectinas como Peanut agglutinin (PNA) (Purvis y cols., 1990) o Pisum sativum agglutinin (PSA).

Solamente los espermatozoides con el acrosoma intacto penetrarán el *cumulus oophorus* y podrán unirse y atravesar la ZP. La RA espontánea prematura, impide la unión de espermatozoides a la ZP. Tesarik (1989) demostró

que los ensayos de RA son útiles bajo determinadas condiciones y que deben ser diseñados para distinguir entre RA espontánea e inducida. El descubrimiento de que la RA debe comprobarse a lo largo del tiempo, originó el desarrollo de nuevos ensayos que proporcionan una visión más real del comportamiento fisiológico del espermatozoide.

El ensayo de RA inducida con ionóforo introducido por Cummins y cols. (1991) utiliza el ionóforo para inducir la entrada de calcio en los espermatozoides capacitados evaluando la respuesta que se produce a dicho estímulo. Se trata de una herramienta útil para determinar la capacidad que tienen los espermatozoides de reaccionar, aunque el estímulo utilizado provoca un flujo de calcio, diferente al que se produce en condiciones fisiológicas (Zaneveld y cols., 1993).

La progesterona es otra sustancia que ha sido utilizada para la inducción de la RA (Oehninger y cols., 1994). Aunque la progesterona hace aumentar la concentración intracelular de calcio (Emiliozzi y cols., 1996), se han obtenido resultados contradictorios en su uso como inductor de la RA. De hecho, recientemente Harper y Publicover (2005) han observado que si el espermatozoide se expone a un gradiente de progesterona, se produce un ligero aumento de calcio intracelular que conlleva modificaciones en el tipo de batido del flagelo, pero que no provoca la RA.

Otros inductores de la RA que se han utilizado son las células del *cumulus oophorus* (Tesarik, 1985), por la capacidad de sintetizar progesterona que poseen, aunque esto no ha sido confirmado por algunos autores (Hoshi y cols., 1993), el moco cervical (Perry y cols., 1996) o el fluido folicular (Liu y Baker, 1994).

En condiciones fisiológicas la RA ocurre tras la interacción con la ZP, después de la unión del receptor espermático con la proteína ZP3 (en humano y ratón) o ZP4 (en porcino y bovino). Por este motivo se ha utilizado la ZP intacta o solubilizada como agentes inductores de la RA (Liu y Baker, 1996a; Bastiaan y

Franken, 2007). Sin embargo se ha demostrado que la cantidad de ZP intacta necesaria para inducir la RA es menor que la cantidad de ZP solubilizada (Liu y Baker, 1996b), por lo tanto se considera importante la estructura tridimensional de ésta.

La ZP solubilizada humana ha sido utilizada a nivel clínico en casos de fallo de fecundación (Esterhuizen y cols. 2001) como prueba diagnóstica, y recientemente se ha comprobado que también es capaz de provocar la hiperactivación espermática (Bastiaan y Franken, 2007). La cantidad necesaria de ZP solubilizada para inducir la RA oscila en torno a 1-2 zonas/ìl, por lo que se han diseñado microensayos que utilizan pequeños volúmenes, debido a que el número de ZP es muy limitado (Bastiaan y cols., 2002).

Teniendo en cuenta que la obtención de ZP es muy limitada, los investigadores han trabajado en la síntesis de ZP3 humana recombinante, habiéndose obtenido diferentes resultados según los autores. Brewis y cols. (1996), Bray y cols. (2002) y Chakravarty y cols. (2005) han publicado la obtención de ZP humana recombinante con actividad biológica, mientras que Martic y cols. (2004) obtuvieron una proteína recombinante sin la actividad biológica esperada. Recientemente, Ni y cols. (2006) han publicado los resultados obtenidos utilizando diferentes péptidos aislados de ZP humana recombinante, en los que se demuestra que provocan un aumento de calcio intracelular e inducen la RA. A pesar de ello, hasta la fecha, a nivel clínico no se dispone de ZP humana recombinante que pueda ser utilizada con fines diagnósticos.

La presencia del acrosoma y su habilidad para funcionar apropiadamente es esencial para el potencial de fecundación de los espermatozoides y ello fue demostrado hace años al observar que los espermatozoides sin acrosoma son incapaces de penetrar las cubiertas del ovocito (Schill, 1974). El fallo de fecundación fue también demostrado en espermatozoides que tienen un gran porcentaje de cabezas redondas (Jeyendran y cols., 1976). Además, se ha comprobado que el potencial de fecundación de una muestra puede estar

disminuido por los defectos de la estructura o la función del acrosoma (Schill, 1991).

La capacidad de inducción de la RA se ha correlacionado con la penetración espermática de la ZP (Liu y Baker, 1996 b), una de las principales barreras que debe atravesar el espermatozoide. Basándonos en ello, se puede concluir que la capacidad de los espermatozoides para que la RA sea inducida puede proporcionar información para el tratamiento de la infertilidad. El estado del acrosoma también puede ser usado para determinar el daño después de la congelación/descongelación de una muestra, ya que dicho proceso afecta al número de acrosomas intactos (Cross y Hanks, 1991).

Los espermatozoides sufren de forma espontánea la RA durante la incubación en un medio en bajos porcentajes (Fénichel y cols., 1991). El significado fisiológico de esta RA espontánea todavía no se conoce, pero parece que representa un acontecimiento no deseado. De hecho la RA espontánea prematura parece ser una alteración deletérea (Takahashi y cols., 1992). La pérdida prematura del acrosoma, impide que el espermatozoide se una a la ZP y de hecho esta inducción prematura es el mecanismo de acción de algunas sustancias utilizadas con fines anticonceptivos como el "SAMMA" que es capaz de provocar la exocitosis del acrosoma incluso en espermatozoides no capacitados, mediante una entrada masiva de calcio (Anderson y cols. 2006).

Teniendo en cuenta que de forma fisiológica se produce la RA en cierto grado, lo que se denomina RA espontánea, cuando se valora la capacidad de respuesta del espermatozoide a un inductor de la RA, los resultados deben valorarse descontando previamente ese porcentaje de RA espontánea, siendo esta una forma más correcta de evaluar la función acrosomal (Cummins y cols., 1991; Fénichel y cols., 1991; Henkel y cols., 1993).

En cualquier caso el valor de corte de la inducción de RA, para discriminar entre muestras fértiles e infértiles, difiere entre estudios y sigue sin determinarse

cual es el valor que proporciona el mejor significado biológico. Calvo y cols., (1989) encontraron que este parámetro estaba reducido en casos de infertilidad de origen desconocido aunque la actividad acrosina podía también estar reducida (Koukoulis y cols., 1989). Fénichel y cols., (1991) encontraron una baja respuesta al estímulo del ionóforo de calcio en casos repetidos de fallos de fecundación *in vitro* de etiología desconocida cuando usaron como valor de corte de la inducción de la RA el 20%. Parinaud y cols. (1995) obtuvieron una predicción del 83% de los resultados de FIV por combinación de los parámetros de motilidad y morfología con RA espontánea y RA inducida.

Pampiglione y cols., (1993) consiguieron diferenciar entre hombres fértiles e infértiles y encontraron fallo de fecundación del 100% cuando el valor de corte para espermatozoides reaccionados era del 31%. Por otro lado, Cummins y cols. (1991) usaron el 5% como valor de corte y obtuvieron un valor de predicción del 90%. Henkel y cols. (1993) sugieren el valor de 7.5% para inducción de la reacción en espermatozoides como indicativo de subfertilidad.

A la vista de los datos, es evidente que no se ha establecido un valor de corte de referencia, debido en parte a que en muchos casos los resultados obtenidos entre laboratorios no pueden ser comparados, ya que la metodología usada para la inducción de la RA o para la evaluación de la RA es diferente, al igual que puede variar el criterio de clasificación de los pacientes fértiles o infértiles.

La funcionalidad del acrosoma puede además asociarse a otras anomalías del espermatozoide. Por ejemplo, en astenozoospermia la ratio de inducción de RA es reducida (Pilikian y cols., 1992). En casos severos de teratozoospermia el flujo de calcio, y la RA inducida y espontánea presenta defectos (Oehninger y cols., 1994), mientras que en pacientes teratozoospermicos la RA inducida está significativamente relacionada con las ratios de fecundación (Liu y Baker, 1998).

Los problemas que son causados por un defecto de la RA pueden ser debidos a una insuficiente RA en cuyo caso el uso de un medio y un estímulo adecuado como la pentoxifilina (PF) que puede ser beneficioso, o deberse a una RA prematura anormalmente alta, para lo cual el tratamiento con yema de huevo ha demostrado disminuir la ratio de reacción espontánea, e incrementar el número de espermatozoides unidos a la ZP (Tesarik y Mendoza, 1995).

Las pruebas de inducción de RA permiten identificar aquellas muestras en las cuales los espermatozoides no pueden sufrir la RA y por lo tanto no pueden penetrar el ovocito, incluso cuando la capacitación es normal. En estos casos la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) podría ser la opción elegida para conseguir la fecundación de los ovocitos, aunque algunos autores como Fraser (1998) opinan que esta técnica sólo debería usarse cuando los espermatozoides son incapaces de conseguir fecundar con sistemas de FIV convencional y la inducción de la RA puede ayudar en la identificación de casos donde sea necesario emplear esta técnica.

1.3.3.2.3. Ensayos de interacción o unión a ZP

La ZP representa una barrera a la que el espermatozoide debe unirse como paso previo a la penetración del ovocito (Yanagimachi, 1981, 1994). Además, se ha demostrado que la capacidad del espermatozoide para unirse a la ZP y sufrir la RA tiene un alto valor de predicción sobre el rendimiento de la FIV en la especie humana (Oehninger y cols., 2000).

Diferentes autores han desarrollado ensayos que estudian la capacidad de los espermatozoides para unirse a la ZP. Los dos ensayos de este tipo más comúnmente utilizados en la especie humana son el ensayo competitivo de unión a la zona intacta (Liu y cols., 1988) y el ensayo de unión a la hemizona (HZA, "hemizona assay") desarrollado por Burkman y cols. (1988), como una variante del anterior. En esta técnica se obtienen dos hemizonas por microsección del ovocito lo que permite obtener dos superficies con una funcionalidad equivalente

a la ZP intacta; una será utilizada por el control y otra por la muestra problema, de modo que el resultado se obtiene como una ratio entre ambos (HZI, "hemizona index"). Ambos estudios, aunque presentan diferencias en la metodología utilizada, evalúan la capacidad de los espermatozoides de unirse firmemente a la ZP. Dichos estudios presentan alto valor de predicción positivo y negativo, además de un bajo porcentaje de falsos negativos (Oehninger y cols., 2000).

En la especie porcina, Berger y cols. (1989) optimizaron las condiciones del ensayo de unión a zona y detectaron variaciones en el número de espermatozoides unidos entre distintos verracos y entre eyaculados de un mismo verraco. Del mismo modo, Ivanova y Mollova (1993) observaron diferencias significativas en el número de espermatozoides unidos a la zona entre grupos de verracos fértiles y subfértiles. Además, el test de hemizona también ha sido utilizado con espermatozoides de otras especies animales como caballo (Fazeli y cols., 1995), toro (Fazeli y cols., 1993), perro (Ström Holst y cols., 2000), morueco (Perez y cols., 2000) y verraco (Fazeli y cols., 1997). Tanto Coddington y cols. (1991) en la especie humana, como Fazeli y cols. (1995) en el caballo y Fazeli y cols. (1993) en el toro, describen cómo el número de espermatozoides unidos a la zona es superior en los individuos fértiles que en los subfértiles.

Otro tipo de ensayos son aquellos que estudian las interacciones del espermatozoide con la ZP, no sólo su capacidad de unión. Para ello se determina la capacidad de sufrir la RA de los espermatozoides que se han unido de forma activa a la ZP y como consecuencia de ello se ha producido la inducción de la RA. Liu y Baker desarrollaron en 1996 un ensayo para estudiar la RA de los espermatozoides unidos a la ZP en la especie humana, cuya representación esquemática se refleja en la **figura 8**.

En un estudio realizado en 2003, Liu y Baker obtuvieron una alta correlación entre el porcentaje de inducción de RA con ZP (ZPIAR, "zona pellucida induced acrosome reaction") y el porcentaje de fecundación. Los

pacientes con un valor de ZPIAR $\leq 16\%$ presentaban una media de fecundación del 23%, mientras que con ZPIAR $>16\%$ tuvieron una media de la ratio de fecundación del 61 %. Estos datos están en concordancia con los resultados obtenidos por Franken y cols., (2000) y Bastiaan y cols., (2003) en los que utilizaron la ZP humana solubilizada como inductor de la RA.

1.3.3.2.4. Ensayos de penetración de espermatozoides en ovocitos libres de ZP

Tal y como se indica en el apartado correspondiente a la ZP, dicha estructura está considerada como la responsable del establecimiento de la especificidad de especie, y tras su eliminación esta especificidad desaparece en muchos casos. Por ello, los ovocitos sin ZP de algunas especies, como el hámster, pueden ser penetrados por espermatozoides de otras especies. Este fenómeno de penetración heteróloga, en ovocitos de hámster sin ZP, fue utilizado por primera vez por Yanagimachi y cols. (1976) para espermatozoides humanos, y durante los últimos 25 años ha sido ampliamente utilizado para evaluar la habilidad de espermatozoides heterólogos para capacitarse, sufrir la RA, fusionarse con el oolema y descondensarse en el ooplasma (Rodgers y cols., 1979; Liu y Baker, 1992). Ha sido empleado para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides en roedores (Hanada y Chan, 1976), conejo (Hanada y Chan, 1978), cerdo (Imai y cols., 1980; Berger y Horton, 1988), toro (Bousquet y Brackett, 1982), cabra (Berger, 1989), y oveja (Choudhry y cols., 1995) entre otros.

Este ensayo ha recibido diferentes denominaciones, entre las que figuran las siguientes: ensayo de penetración espermática (SPA, sperm penetration assay), penetración de ovocitos de hámster libres de ZP (HESPA, zona-free hamster egg sperm penetration assay), test de hámster, etc.

Numerosos trabajos han estudiado la relación entre los resultados del ensayo de penetración espermática y el rendimiento de la FIV. Para ello se han establecido valores de corte según el número de ovocitos sin ZP penetrados, que permitían la clasificación de las muestras en dos categorías: muestras de alta o de baja fertilidad. Los porcentajes de penetración establecidos como valor de corte, entre las dos categorías varían según los estudios y oscilan entre el 10 % y el 20 % de ovocitos heterólogos penetrados (Oehninger y cols., 2000), permitiendo obtener predicciones cuya correlación con los resultados de FIV se aproximan al 80 % en algunos estudios (Freeman y cols., 2001).

Desde el punto de vista clínico, esta prueba ha sido correlacionada tanto con el rendimiento de la FIV humana (Aitken y cols., 1987) como con la tasa de gestación en estudios prospectivos con pacientes que mostraban infertilidad idiopática (Aitken y cols., 1991).

De hecho, a pesar de la complejidad del mismo y la necesidad de personal técnico especialista para su estandarización, se considera uno de los ensayos más sensibles para medir la funcionalidad del espermatozoide, que junto a las interacciones con la ZP, proporcionan información valiosa sobre diferentes aspectos de la función espermática (Oehninger y cols., 2000; Aitken, 2006).

Sin embargo, se ha demostrado que este ensayo conlleva un alto porcentaje de falsos negativos en la predicción del éxito de la FIV convencional, por lo que se han desarrollado modificaciones que permiten disminuir el porcentaje de falsos negativos (Zahalsky y cols., 2003).

Actualmente, este ensayo está en desuso en las clínicas de reproducción asistida por diferentes causas. Una de ellas se basa en el hecho de que en los roedores la fecundación depende del centrosoma materno (Schatten y cols., 1991), mientras que en la especie humana el centrosoma es introducido por el espermatozoide (Simerly y cols., 1995); consecuentemente, el espermatozoide

humano no puede formar los microtúbulos en estos ovocitos cuando es microinyectado (Hewitson y cols., 1997). Además se añaden otros inconvenientes para el uso de ovocitos de roedores como son la necesidad de criar los animales en instalaciones específicas para este fin y el control preciso del ciclo estral de las hembras para su sacrificio y recogida de los ovocitos.

Por el contrario, otros mamíferos como el cerdo y la vaca también disponen de centrosoma de origen paterno (Kim y cols., 1996) y además ofrecen enormes ventajas en cuanto a la disponibilidad ilimitada de gametos femeninos obtenidos en mataderos comerciales; este hecho, junto con la existencia de sistemas de maduración *in vitro* bien establecidos para estas especies (Coy y cols., 2005a; 2005b; Mermillod y cols., 1999), hacen que la posibilidad de desarrollar pruebas de funcionalidad espermática con ovocitos porcinos o bovinos libres de zona pélucida haga interesante su estudio.

1.3.3.2.5. ICSI heteróloga

En general, los ovocitos de mamíferos disponen de mecanismos que previenen la entrada de espermatozoides de otras especies, a nivel de la ZP (Yanagimachi, 1994), aunque la fecundación interespecífica ha sido demostrada por diferentes laboratorios (revisado por Li y cols., 2003). Hoy día las técnicas de microinyección espermática permiten sobrepasar la ZP e introducir el espermatozoide seleccionado (homólogo o heterólogo) directamente al interior del ooplasma, por lo que en estos casos el interés reside en el estudio de la interacción del espermatozoide con el ooplasma.

En estos casos, la mayor barrera conocida en cuanto a especificidad de especie, la ZP, no participa aunque se ha descrito la existencia de cierta especificidad a nivel del citoplasma en cuanto a la capacidad de activación del ovocito y formación de pronúcleos entre ovocitos de cerdo sin ZP y espermatozoides de rata (Zhao y cols., 2002).

La ICSI permite, entre otros usos, evaluar los eventos que se producen después de la introducción del espermatozoide en el ovocito, incluso utilizando ovocitos heterólogos, lo cual es de gran interés para los estudios de infertilidad humana. Dichos eventos post-ICSI corresponden a la desintegración del acrosoma, descondensación del núcleo, organización del centrosoma, formación de microtúbulos, activación del ovocito y migración del pronúcleo entre otros.

En la bibliografía revisada sobre el tema, se comprueba la existencia de estudios que han utilizado ovocitos de ratón (Rybouchkin y cols., 1995), hámster (Ahmadi y Ng, 1999), cerdo (Kim y cols., 1999), vaca (Nakamura y cols., 2001) o conejo (Terada y cols., 2004) en ICSI heteróloga con diferentes fines, entre los que figuran el estudio de la activación del ovocito, el estudio del cariotipo del espermatozoide humano (Rybouchkin y cols., 1995), la capacidad de descondensación del núcleo espermático y la formación pronuclear (Ahmadi y Ng, 1999), o la funcionalidad del centrosoma del espermatozoide humano (Nakamura y cols., 2001; Terada y cols., 2004b).

Como se ha comentado en el apartado anterior, los ovocitos de roedores presentan algunos inconvenientes frente al uso de ovocitos de animales de abasto como la cerda o la vaca, por lo que sería interesante estudiar si la microinyección de espermatozoides humanos en ovocitos porcinos o bovinos podría utilizarse como test de funcionalidad espermática. Nakamura y cols. (2001) utilizaron ovocitos de vaca para microinyectar espermatozoides humanos, provocando la activación artificial de los ovocitos, mediante pulsos piezo eléctricos y alcohol y estudiaron la funcionalidad del centrosoma del espermatozoide.

En la especie porcina, Kim y cols. (1999) utilizaron ovocitos de cerda para la microinyección de espermatozoides de diferentes orígenes (porcino, bovino, murino y humano) y obtuvieron formación pronuclear y aposición de los pronúcleos para todas las especies, aunque ninguna de las fecundaciones heterólogas alcanzó el estadio de dos células. Sin embargo estos autores no

propusieron su aplicación para evaluar la funcionalidad espermática, estudiando parámetros como la capacidad de activación del ovocito, descondensación del núcleo o la formación de pronúcleos.

1.3.3.2.6. FIV homóloga y heteróloga.

Entre los bioensayos de interacción de gametos, los ensayos de fecundación son los más completos, por ser los que evalúan de forma conjunta mayor número de procesos implicados en la fecundación.

Según First y Parrish (1987), la FIV homóloga con ovocitos que mantienen la zona intacta permite obtener una mejor predicción de la fertilidad que los análisis rutinarios de evaluación del semen. Sin embargo este ensayo, tiene evidentes limitaciones éticas para su uso en la especie humana, aunque su desarrollo sí es posible en especies animales. Por ejemplo, en cerdo ha sido muy utilizado y se ha demostrado que es posible el uso tanto de ovocitos maduros *in vitro* (Xu y cols., 1995), como ovocitos inmaduros (Martínez y cols., 1993; Matás y cols., 1996). Además, los resultados demuestran que en la especie porcina existe una buena correlación entre los resultados de fecundación *in vitro* y el resto de parámetros convencionales, a excepción de la concentración espermática y la tinción vital con eosina-nigrosina (Gadea y Matás, 2000).

En la actualidad es posible el uso de ovocitos vitrificados para su uso en los test de penetración. Recientemente Macedo y cols. (2006) han demostrado que los ovocitos porcinos vitrificados pueden utilizarse para predecir la fertilidad de verracos, siendo el test de penetración el único método capaz de identificar la reducción de la calidad seminal tras 72 horas desde la recogida.

Además, la fecundación heteróloga utilizando gametos procedentes de animales de producción es utilizada para el estudio de la calidad espermática de especies de animales salvajes y /o en peligro de extinción (McHugh y Rutledge, 1998; Roth y cols., 1998) y se considera de gran interés como herramienta para la

selección de las muestras más idóneas a utilizar en los programas de recuperación de estas especies (Roth y cols., 1999). En bóvidos es a menudo utilizada por lo que se ha sugerido que existe una escasa especificidad de especie (Hugh y Rutledge, 1998).