

## 4. DISCUSIÓN

Como se mencionó al principio del presente trabajo, y se ha podido comprobar durante el desarrollo del mismo, la fecundación es uno de los procesos biológicos descritos más fascinantes, y a la vez más complejos. Su estudio despierta el interés de muchos científicos, a la vez que desalienta a otros tantos por su complejidad. Los fines primordiales por los que sigue siendo objeto de interés científico son: aumentar el conocimiento y utilizarlo para mejorar las técnicas de reproducción, habida cuenta del incremento de los problemas de fertilidad que atentan contra la especie humana en pleno siglo XXI (Shur y cols., 2004).

Los experimentos y resultados descritos hasta ahora en este documento han pretendido aportar alguna luz al conocimiento sobre las interacciones *in vitro* espermatozoide-ovocito entre gametos homólogos y heterólogos y buscar una aplicación práctica de los mismos.

### 4.1. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HOMÓLOGA

La zona pelúcida es una de las barreras más importantes que debe superar el espermatozoide para fecundar al ovocito (Yanagimachi, 1994) y ha sido protagonista desde hace muchos años de ambiciosos trabajos de investigación. Su importancia se realiza bajo condiciones *in vitro*, donde las demás barreras a las que debe sobreponerse el espermatozoide *in vivo* han sido suprimidas.

La importancia de la ZP reside en las trascendentales funciones que le han sido atribuidas, entre ellas: la unión del espermatozoide, el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión (Litscher y Wassarman, 2007; Thibier, 2006; Wong y Wessel, 2006).

Atendiendo a los mecanismos responsables de la unión del espermatozoide a la ZP se comprueba que a pesar de la multitud de trabajos publicados al respecto, no se conocen de forma cierta. Una de las tendencias propuesta a finales de los

años 80, apuntaba a que los carbohidratos presentes en la ZP son los responsables de la unión del espermatozoide, avalada por importantes trabajos de los grupos de investigación como los del Dr. Wassarman y el Dr. Shur. Aproximadamente una década después otros autores propusieron la participación de las proteínas en la unión ZP-espermatozoide (Rankin y Dean, 1996), mediante un mecanismo supramolecular en el que se integraban las glicoproteínas (Hoodbhoy y cols., 2005) atribuyendo a los azúcares una función en el establecimiento de la especificidad de especie de esa unión (revisado por Clark y Dell, 2006).

Respecto a la polispermia los mecanismos descritos para su bloqueo implican el “hardening” o endurecimiento de la ZP, la proteólisis y la eliminación de receptores para la unión de espermatozoides (Wang y cols., 2003; Gardner y Evans, 2006; Gardner y cols. 2007). Clásicamente se ha propuesto que dichos mecanismos son consecuencia de la exocitosis de los gránulos corticales (Austin y Braden, 1956), lo cual conlleva modificaciones a nivel del oolema y de la zona pelúcida, según las especies (Bleil y Wassarman, 1980; Wassarman, 1994).

Sin embargo, este bloqueo que funciona adecuadamente en condiciones fisiológicas, demuestra una baja eficacia *in vitro*, encontrando su máxima imperfección en el cerdo. Esta especie ha sido un ejemplo clásico del problema de la polispermia *in vitro*, (Wang y cols., 1998; Coy y cols., 2002; Abeydeera, 2002), a diferencia de lo que ocurre *in vivo*, donde los valores de polispermia no superan el 5% (Hunter, 1991). En la vaca, la polispermia es menos frecuente, aunque también causa una disminución significativa del rendimiento de la FIV, como se demuestra en este trabajo y ha sido publicado previamente (Wang y cols., 1997; Coy y cols., 2005).

Las causas responsables de estos fallos en el bloqueo de la polispermia son numerosas. Entre ellas figuran una inadecuada maduración *in vitro* de los ovocitos, lo que provoca una exocitosis defectuosa de los gránulos corticales (Sun, 2003), excesivo tiempo de vida de los ovocitos utilizados (envejecimiento,

Wortzman y Evans, 2005), alta proporción espermatozoides/ovocito, defectos a nivel de la zona pelúcida o inadecuada composición de los medios de cultivo con excesiva presencia de proteínas (Wang y cols., 2003).

El endurecimiento de la ZP es uno de los supuestos mecanismos implicados en el bloqueo de la polispermia, que se produce como consecuencia de la reacción cortical (Wassarman, 1988). Sin embargo, Coy y cols. (2002) demostraron que, tras la fecundación *in vitro*, no se producía endurecimiento de la ZP, y Romar y cols. (2005) sugieren que esa falta de endurecimiento podría ser una de las causas de los altos porcentajes de polispermia observados en los sistemas *in vitro*.

Un método utilizado en el laboratorio para cuantificar el grado de endurecimiento de la ZP consiste en medir el tiempo necesario para eliminar esta estructura mediante una digestión enzimática. Según Green (1997) el aumento del tiempo de digestión con pronasa, conocido también como endurecimiento de la ZP o “hardening”, no corresponde estrictamente a un aumento de su resistencia física, sino a un aumento de la resistencia a la acción proteolítica, lo cual se debe a cambios o alteraciones que dificultan el acceso de las enzimas proteolíticas, bien por un enmascaramiento de los sitios de unión o por un aumento de los entrecruzamientos entre las proteínas que evitan su despliegue.

Entre los agentes que podrían provocar un endurecimiento en la ZP mediante el establecimiento de entrecruzamientos de las proteínas que la forman, decidimos utilizar el DTSP, DSP o agente de *Lomant*, por su capacidad para reaccionar con los grupos amina de las lisinas, que son muy abundantes en las proteínas de la ZP. De este modo, el método utilizado provoca un endurecimiento imitando el endurecimiento observado *in vivo* de los ovocitos ovulados (Broermann y cols. 1989; Wang y cols. 1998), y permite estudiar el efecto del endurecimiento sobre el bloqueo de la polispermia.

- 4.1.1. El tratamiento de los ovocitos porcinos con el agente químico DTSP incrementa la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con pronasa, favorece la monospermia y aumenta el rendimiento de la fecundación *in vitro*.

Algunos estudios han demostrado que los ovocitos porcinos madurados *in vivo* y recogidos de folículos preovulatorios o madurados *in vitro*, presentan tiempos de digestión con pronasa muy inferiores (100s Kolbe y Holtz, 2005; entre 137 y 175s Coy y cols., 2002) a los obtenidos para ovocitos ovulados recogidos de oviducto (más de 24 horas Broermann y cols., 1989; 2 horas Wang y cols., 1998; 47 minutos Kolbe y Holtz, 2005).

A la vista de estos resultados, el DTSP se utilizó para comprobar si provocaba entrecruzamientos entre los grupos  $\text{NH}_2$  de las proteínas de la ZP y era efectivo provocando el endurecimiento de la misma. Los resultados demostraron que el sistema utilizado provoca un aumento significativo en el tiempo de digestión con pronasa o endurecimiento, con valores que llegan a ser 57 veces superiores a los del grupo control de ovocitos de MIV y superiores a los tiempos obtenidos previamente, para este tipo de ovocitos, por Coy y cols. (2002), aunque en este caso se utilizara una solución de pronasa al 0,1% (w/v) en vez de al 0,5%.

Teniendo en cuenta el mecanismo de acción del DTSP, el cual forma enlaces covalentes tipo amida entre las aminas primarias de las proteínas, aumentando los entrecruzamientos de las mismas y proporcionando mayor estabilidad, los resultados están en concordancia con lo descrito por Green (1997), el cual afirma que el aumento de entrecruzamientos entre las proteínas de ZP es causa de un endurecimiento de dicha ZP (entendido como aumento del tiempo de digestión). De este modo queda demostrado que mediante la utilización del agente DTSP, bajo las condiciones descritas puede producirse un endurecimiento de la ZP de ovocitos porcinos madurados *in vitro* de forma previa a la fecundación.

En relación a la FIV, existen referencias en la bibliografía que demuestran que los ovocitos ovulados presentan altos tiempos de digestión con pronasa y que cuando se utilizan éstos en sistemas de FIV, los resultados obtenidos son mejores que con ovocitos madurados *in vitro* (Wang y cols., 1998; 2003), lo cual sugiere que existe cierto grado de endurecimiento en la ZP, previo a la fecundación, que puede ser beneficioso para los resultados de FIV.

En nuestro caso, los ovocitos que habían sido madurados *in vitro* y sometidos a un tratamiento con DTSP, presentaron tiempos de digestión con pronasa elevados y se observó una disminución considerable de los valores de polispermia y número de espermatozoides/ovocito. El tratamiento supuso una mejora de los rendimientos del sistema de FIV alcanzando valores en torno al 48%, a excepción del grupo en el que se utilizó la concentración más elevada de DTSP en el cual provocó una disminución del porcentaje de penetración. Estos resultados superan los mejores rendimientos obtenidos en FIV porcina hasta el momento, utilizando ovocitos madurados *in vitro* con diferentes sistemas alternativos de FIV (uso de pajuelas para FIV, adición de proteínas específicas de oviducto, uso de osteopontina) con los que se obtienen rendimientos finales entre el 38 % (Li y cols., 2003) y el 45 % (McCauley y cols., 2003; Hao y cols., 2006).

Se considera que los resultados obtenidos de FIV se deben al aumento de entrecruzamientos entre las proteínas por el efecto del DTSP, lo que conlleva una mayor dificultad de penetración para los espermatozoides de acuerdo a lo descrito por Iwamoto y cols. (1999), y a su vez implica que el número de espermatozoides por ovocito y el porcentaje de polispermia disminuyan. De hecho, se comprobó que con la concentración más elevada, la penetración disminuye considerablemente, posiblemente debido a una excesiva formación de entrecruzamientos que impide la entrada del espermatozoide.

El efecto gradual de las concentraciones utilizadas sobre los tres parámetros de FIV analizados (penetración, monospermia y número de

espermatozoides/ovocito) indica que los lugares sobre los que actúa el DTSP a estas concentraciones no han sido saturados, por lo que el uso de concentraciones más altas, previsiblemente causaría mayores efectos sobre los parámetros evaluados, aunque no sería de esperar una mejora del rendimiento de la FIV, pudiendo ser utilizadas para otros fines.

A pesar de utilizar tiempos de coincubación con el DTSP relativamente cortos (30 minutos), el producto provocó un efecto mayúsculo, lo cual se explica atendiendo a los grupos NHS-éster que contiene el DTSP, los cuales reaccionan rápidamente con las moléculas que contienen aminas primarias como las proteínas de la ZP.

4.1.2. El tratamiento de los ovocitos bovinos con el agente químico DTSP incrementa la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con pronasa y favorece la monospermia, pero no aumenta el rendimiento de la fecundación *in vitro*.

En rumiantes, el problema de la polispermia es menos acusado, aunque las observaciones en el laboratorio y algunos trabajos publicados demuestran que también se produce (Wang y cols., 1997; Coy y cols., 2005), pero el número de estudios publicados es mucho más reducido. Sin embargo, el mayor valor de estos animales, en relación a los cerdos y el avanzado estado de la biotecnología de la reproducción, hacen interesante su estudio.

Analizando los tiempos de digestión con pronasa, obtenidos para ovocitos bovinos madurados *in vitro*, se observa que éstos fueron ligeramente inferiores en los grupos control a los descritos por Bielanski y cols. (2003), los cuales obtuvieron valores entre 3´6 y 3´8 minutos, a pesar de utilizar una solución al 1% de pronasa. Sin embargo, se considera que estas diferencias no suponen una discordancia con los valores obtenidos en nuestro estudio, ya que las condiciones utilizadas (tipo de pronasa, temperatura de incubación, volumen de

enzima/ovocito) pueden variar entre laboratorios y ser la causa de las diferencias observadas.

En cuanto a los valores obtenidos en nuestro estudio para los grupos de ovocitos tratados con DTSP, éstos fueron 14 veces superiores a los obtenidos en los grupos control, siendo las diferencias altamente significativas.

Comparando los resultados obtenidos en ambas especies (porcino y bovino), bajo las mismas condiciones de digestión, se observaron diferencias interespecíficas tanto en los grupos control como en los tratados con DTSP. Los tiempos de digestión de los grupos control correspondientes a la especie bovina fueron aproximadamente el doble a los obtenidos en porcino. En los grupos tratados con DTSP, los tiempos en la especie porcina fueron 57 veces mayores que en el control, mientras que en la especie bovina el incremento fue del orden de 14 veces, como ya hemos señalado. Es evidente que en los grupos control la ZP bovina presenta una mayor estabilidad o mayor resistencia a la digestión con pronasa que la ZP porcina. Esto concuerda con que los porcentajes de polispermia observados en la especie bovina, de forma general, sean menores que en el caso de la especie porcina, sin considerar otros muchos factores que pueden afectar. Quizás debido a su mayor estabilidad *per sé*, el tratamiento con DTSP provocó un efecto menor sobre la ZP bovina que sobre la ZP porcina.

Sin embargo, observando los valores absolutos de tiempo de digestión con pronasa de ovocitos porcinos y bovinos tratados con DTSP, es evidente que a pesar de ser menor dicho tiempo en la vaca (lo cual indicaría un menor endurecimiento) los porcentajes de monospermia son superiores a los de la especie porcina. Esto sugiere que en la especie bovina el bloqueo de la polispermia puede depender en menor grado del endurecimiento de la ZP que en el caso del cerdo, existiendo otros mecanismos que actúen de forma eficaz en este bloqueo, posiblemente relacionados con el contenido de los gránulos corticales. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en FIV bovina con ovocitos no tratados, donde se obtienen valores superiores al 50% de

monospermia, mientras que en el cerdo en estas circunstancias los valores de monospermia están entre el 5 y el 10% para los machos utilizados.

Además, como se observa en los resultados, el porcentaje de fecundación en el grupo de ovocitos bovinos tratados con DTSP fue significativamente inferior al de los ovocitos control, lo cual impidió que el rendimiento final del sistema de FIV mejorara con el tratamiento, a pesar del aumento de monospermia obtenido con ese grupo. Al parecer, el aumento de los entrecruzamientos entre las proteínas de la ZP bovina supuso una dificultad excesiva para los espermatozoides de toro a la hora de atravesarla.

4.1.3. El tratamiento de los ovocitos porcinos con fluido oviductal incrementa de modo reversible la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa, favorece la monospermia y aumenta el rendimiento de la fecundación *in vitro*.

Es conocido que el lugar natural en que se produce la fecundación propiamente dicha, entendida como la unión íntima del ovocito y el espermatozoide, es el oviducto, donde existe un ambiente exquisitamente regulado, en el cual la composición del fluido, temperatura o movimiento se consideran importantes causas que pueden influir en el éxito de la fecundación (Hunter, 2005). El fluido oviductal presente en el lumen del oviducto varía su composición y viscosidad en función de la parte del oviducto estudiado y de la fase del ciclo estral de que se trate y está compuesto principalmente por un trasudado del plasma en el que aparecen determinadas glicoproteínas, secretadas por las células del oviducto, junto a restos del fluido folicular y secreciones de las células del cúmulus que rodean a los ovocitos (Buhi y cols., 1992; 1997).

Diferentes autores han demostrado que el paso de los ovocitos por el oviducto provoca cambios en la ZP en cuanto a su composición, analizada mediante electroforesis, y en relación al tiempo de digestión con pronasa, el cual se ve incrementado (Brown y Cheng, 1986; Hedrick y Wardrip 1987; Broerman y cols., 1989). Además, la fecundación *in vitro* utilizando ovocitos madurados *in vivo* y recogidos de oviducto permite obtener mejores resultados, con disminución de los porcentajes de polispermia en comparación a los resultados obtenidos cuando se utilizan ovocitos madurados *in vitro* (28% vs 65%, Wang et al., 1998).

Atendiendo a la composición del fluido oviductal, Broerman y cols. (1989) propusieron que el aumento del tiempo de digestión con pronasa se debía al efecto de las proteínas oviductales que se unían o eliminaban durante el paso del ovocito por el oviducto. Aunque el mecanismo de acción de estas glicoproteínas continúa sin ser conocido completamente, Buhi y cols. (1993; 1997) comprobaron mediante microscopía electrónica que existían glicoproteínas específicas del oviducto de cerda que se asocian con la ZP, alcanzando el espacio perivitelino y la membrana plasmática de ovocitos no fecundados y embriones tempranos, pero no aparecían en ovocitos foliculares. Estas proteínas, al unirse a la ZP, podrían dificultar el acceso tanto de los enzimas (y por este motivo se produciría un aumento del tiempo de digestión con pronasa), como de los espermatozoides, lo que justificaría en parte el aumento de monospermia. Sin embargo, esta hipótesis no explican que en los ovocitos recogidos de oviducto y utilizados en FIV continúen produciéndose considerables penetraciones polispérmicas (30% Wang et al., 1998).

Recientemente Kolbe y Holtz (2005) corroboraron que los ovocitos obtenidos *in vivo* presentaban un aumento de la resistencia a la digestión con pronasa, y que éste se producía una vez que el ovocito alcanza el oviducto. Nuestros resultados, en consonancia con los descritos anteriormente en la bibliografía muestran que los ovocitos madurados *in vivo* de origen folicular y los madurados *in vitro* presentan tiempos de digestión con pronasa notablemente inferiores a los tiempos obtenidos para ovocitos recogidos de oviducto (13.691s). Además, por

primera vez se demuestra que los ovocitos porcinos madurados *in vitro* (con baja resistencia a la digestión con pronasa), tras ser coincubados *in vitro* en fluido oviductal bovino, muestran un aumento significativo del tiempo de digestión, alcanzado valores próximos a los observados para los ovocitos de origen oviductal. Este hecho demuestra que el efecto de endurecimiento de la ZP observado *in vivo* también se puede alcanzar *in vitro*, incubando con fluido oviductal los ovocitos por lo que dicho efecto es atribuible a este fluido biológico.

A pesar de que se podría esperar que existiera especificidad de especie en el efecto que provoca el fluido sobre los ovocitos, el fluido oviductal bovino demostró un efecto de endurecimiento tanto sobre los ovocitos porcinos como los bovinos, incluso de mayor intensidad en el caso del porcino. La razón que justifica la utilización de un fluido de origen heterólogo en el presente estudio se debe a que en los ensayos preliminares, se observó una gran variabilidad en el efecto del fluido oviductal porcino según la hembra de la cual procedía la muestra, lo cual también ha sido descrito por Kolbe y Holtz (2005), sin poder atribuir tales diferencias, más que al efecto del individuo. Sería de interés identificar las causas de tales variaciones y su relación con los parámetros reproductivos. Dicha tarea no se presume fácil, debido a la reducida cantidad de fluido que se puede obtener, escapando a los objetivos del presente estudio. Como continuación del mismo, se intentará identificar el factor o factores responsables del endurecimiento en el fluido oviductal y la concentración óptima a emplear en el medio de cultivo para poder mejorar el rendimiento del sistema de FIV porcina.

Un argumento que podría explicar las diferencias que se observan entre el efecto que provoca sobre la ZP el fluido oviductal de origen porcino y bovino, es que la cantidad de oviductina producida en la vaca es mayor que en el caso de la cerda, siempre y cuando se considere que sea la oviductina es la responsable última de dicho endurecimiento.

Una hipótesis por comprobar es que efectivamente el factor oviductal responsable de ese efecto sea la oviductina o glicoproteína oviductal específica,

la cual se sabe que es secretada por las células epiteliales del oviducto en respuesta a las altas concentraciones de estrógenos (Buhi, 2002). De hecho la vaca produce oviductina a nivel del istmo y de la ampolla, mientras que en el caso de la cerda se ha descrito que se producen bajos niveles de esta glicoproteína y solamente a nivel del istmo, en ambos casos bajo la influencia de los estrógenos (Boice y cols., 1990).

*In vivo*, Broerman y cols. (1989) y Kolbe y Holtz (2005) han observado que el incremento del tiempo de digestión con pronasa que aparece en ovocitos de oviducto tras la fecundación disminuye a lo largo del tiempo y llega a desaparecer en estadio de mórula o blastocisto, a nivel del útero. A pesar de que Broerman y cols. (1989) sugieren que existe un efecto lítico a nivel del útero que hace aumentar la susceptibilidad de la ZP a la digestión con pronasa, Kolbe y Holtz (2005) sugieren que la reversibilidad del endurecimiento observada se debe a un efecto de dilución de las proteínas oviductales, las cuales no son secretadas a nivel de útero. En la especie bovina, se ha demostrado que las glicoproteínas de oviducto permanecen unidas al embrión hasta el día siete y en el cerdo hasta la eclosión del embrión (revisado por Buhi, 2002)

Los resultados obtenidos demuestran que el endurecimiento observado tras la incubación con fluido oviductal disminuye a lo largo del tiempo cuando los ovocitos se transfieren a medio TALP, tras el tratamiento con FO. Se observa una disminución gradual del tiempo de digestión de la ZP conforme aumenta el periodo de incubación en medio TALP, siendo la disminución más drástica durante los primeros 15 minutos de incubación, en los cuales se reduce en 4 veces el citado tiempo de digestión. La tendencia que muestra la representación gráfica de los datos sugiere que la reversibilidad del efecto observada en las 2 primeras horas puede deberse a un efecto de dilución de alguna de las sustancias que se unen a la ZP, por lo que al no renovarse el medio, el efecto de dilución va disminuyendo, por saturación del medio. De hecho a las 5 horas, se observa que aún el tiempo de digestión es aproximadamente 10 veces mayor al grupo control,

lo cual podría explicarse ya que existen proteínas de oviducto que se mantienen unidas al embrión hasta el día 7 (Wegner y Killian, 1991).

De acuerdo a lo que ocurre en condiciones fisiológicas, parece lógico que se produzca el endurecimiento de la ZP en el oviducto, lugar donde se produce la fecundación y donde el ovocito está expuesto a los espermatozoides. Sin embargo, después de la fecundación la ZP debe disminuir progresivamente su resistencia o “hardening” hasta permitir que dicha estructura se rompa y el blastocisto eclosiona. Nuestros resultados demuestran que *in vitro* el endurecimiento de la ZP disminuye a lo largo del tiempo una vez que los ovocitos no están en contacto con el fluido oviductal. Esta reversibilidad parcial se puede producir sin la necesidad del factor lítico de origen uterino que proponían Broerman y cols., (1989).

En base al efecto observado sobre la fecundación y disminución de la polispermia obtenida con ovocitos madurados *in vivo* recogidos de oviducto (Wang et al., 1998), diferentes autores han utilizado el cocultivo de ovocitos con células epiteliales de oviducto (Romar y cols., 2001) o la preincubación de ovocitos con fluido oviductal durante la FIV (Kim y cols., 1996) intentando simular las condiciones del oviducto y esperando observar un efecto sobre la fecundación. Otros autores como Kouba y cols. (2000a) y McCauley y cols. (2003) han utilizado directamente la adición de proteínas oviductales porcinas del tipo OGP (*oviductal glycoprotein*), o la adición de osteopontina, otra proteína presente en oviducto de cerda (Hao y cols., 2006), como alternativas para conseguir unos mayores índices de monospermia. Sin embargo, a pesar de haberse obtenido mejoras en el rendimiento de la FIV no se ha desarrollado un sistema donde se incluyan estas sustancias de forma rutinaria para mejorar los rendimientos finales de la técnica.

Los resultados demuestran que la coincubación con fluido oviductal de ovocitos porcinos de MIV permite obtener una mejora importante en los valores de FIV y disminuir el número medio de espermatozoides por ovocito, aumentando de forma significativa el rendimiento respecto al grupo control. El hecho de que los

resultados de rendimiento obtenidos no sean demasiado elevados se debe a las condiciones experimentales empleadas, en las que el sistema de fecundación estaba altamente saturado de espermatozoides (penetración de 95% y polispermia de 91% en el grupo control) con el fin de poder observar mejor el efecto del tratamiento sobre los resultados en el grupo de ovocitos preincubados con fluido oviductal. Previamente, Kim y cols. (1996) observaron que la coincubación de ovocitos porcinos madurados *in vitro* con fluido oviductal porcino provocaba un aumento de la monospermia, pero paralelamente producía una disminución del porcentaje de penetración, que en nuestro caso no se produce. Kouba y cols. (2000a), utilizando glicoproteínas específicas de oviducto porcino (pOSP) demostraron una reducción de la polispermia y del número de espermatozoides unidos a ZP, pero no observaron aumento del tiempo de digestión con pronasa.

Los resultados observados sobre el aumento del tiempo de digestión con pronasa, aumento de la monospermia y aumento del rendimiento de la FIV, tras la coincubación en fluido oviductal de los ovocitos, consideramos que se deben a la acción de las proteínas específicas de oviducto presentes en dicho fluido, especialmente la oviductina, aunque no se descarta que actúen otras sustancias tales como la osteopontina o el inhibidor del activador del plasminógeno. En el caso de la osteopontina se ha demostrado que se produce un pequeño incremento en el tiempo de digestión de la ZP con pronasa, pero muy inferior al obtenido en nuestros experimentos y por lo tanto no comparable (Hao et al., 2006). Es posible que la dilución de la osteopontina en el medio de FIV (TBM, en el caso de Hao et al. 2006) pudiera haber enmascarado su efecto sobre el endurecimiento de la ZP, y que en otras condiciones experimentales su efecto fuera mayor.

Algunos trabajos previos no han obtenido aumento del tiempo de digestión con pronasa tras la adición de proteínas específicas de oviducto (Kouba y cols., 2000a). Sin embargo la metodología utilizada para la obtención de las proteínas difiere bastante de la utilizada en nuestro caso, teniendo en cuenta que asilaron

las proteínas a partir de homogenizados de oviductos completos, por lo que podían existir diferencias entre las proteínas secretas y las que están presentes en el fluido oviductal, que fueron las utilizadas en nuestros experimentos.

A pesar de que el efecto causado por las proteínas oviductales ha sido demostrado *in vivo* y éstas permanecen unidas al ovocito hasta las primeras fases del embrión (Wegner y Killian, 1991; Buhi y cols., 1993), nuestros resultados demuestran que *in vitro* el efecto es reversible parcialmente, en un intervalo de tiempo de 5 horas. Las causas de que se produzcan estas diferencias se puede deber a que las interacciones que se establecen entre las proteínas y la ZP puedan verse afectadas por las condiciones *in vitro* (pH, presión osmótica, temperatura) que difieren de las condiciones en que se produce *in vivo* y han sido demostrados diferentes factores que afectan a esta unión. Por ejemplo Lapointe y Sirard (1996) demostraron que la concentración de calcio puede influir en la capacidad de unión de las proteínas del fluido oviductal a la membrana plasmática de espermatozoides bovinos y sería previsible que afecte también a la unión de las proteínas del fluido oviductal a la ZP.

Los resultados obtenidos sugieren que el endurecimiento de la ZP que acontece como consecuencia de la acción del FO en el oviducto, podría ser un nuevo mecanismo fisiológico implicado en el bloqueo de la polispermia, que no ha sido descrito hasta el momento. Quizás este mecanismo, no considerado *in vitro*, ha sido la causa de la falta de éxito de la FIV en la especie porcina.

4.1.4. El tratamiento de los ovocitos bovinos con fluido oviductal incrementa de modo reversible la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con pronasa.

En el caso de la especie bovina, se ha descrito también que los ovocitos sufren modificaciones en su paso a través del oviducto. *In vitro*, hasta seis proteínas oviductales diferentes se ha demostrado que son capaces de unirse a la ZP (Staros y Killian, 1998). La incubación de ovocitos bovinos en oviductos

provoca modificaciones en la ZP que se manifiestan como endurecimiento de la ZP aumentando desde 3 o 4 minutos observados para ovocitos y embriones obtenidos *in vitro* hasta los 390 y 470 minutos para los incubados en oviductos (Bielanski y cols., 2003).

A pesar de que se ha demostrado que diferentes glicoproteínas del fluido oviductal se unen a la ZP, al espacio perivitelino y al embrión de diferentes especies (ver revisión Buhi y cols., 2000), sus funciones no se conocen con exactitud, aunque se cree que afectan a la capacitación espermática, motilidad y viabilidad además de que tienen efectos sobre la fecundación y el desarrollo embrionario (Buhi, 2002).

Nuestros resultados demuestran que la incubación en fluido oviductal de los ovocitos bovinos madurados *in vitro* provoca un aumento significativo del tiempo de digestión con pronasa (12.657s) frente a los ovocitos de origen folicular (96s) o los madurados *in vitro* (63s). Al igual que para la especie porcina, se observa que el fluido oviductal *in vitro* provoca un efecto de endurecimiento, de modo similar a lo que ocurre en los ovocitos que han estado *in vivo* en contacto con el fluido del oviducto, aunque en bovino los valores obtenidos de la incubación *in vitro* son inferiores a los observados para los ovocitos incubados *in vivo* en oviducto.

También se observa una disminución progresiva del endurecimiento de la ZP tras el cultivo de los ovocitos en medio TALP, que al igual que en la especie porcina es más acusado durante las dos primeras horas, aunque tras 5 horas de incubación el tiempo de digestión con pronasa continúa siendo superior al del grupo control.

Estas observaciones nos indican que, a pesar de que en la vaca el mecanismo de bloqueo de la polispermia dependa en menor medida que en el cerdo del endurecimiento de la ZP, dicho endurecimiento ocurre, y su papel fisiológico podría estar relacionado con la protección o el desarrollo posterior del embrión, hipótesis que planteamos para estudios futuros.

También se plantea la posibilidad de que el endurecimiento que se produce de forma fisiológica en el oviducto, además de contribuir a la monospermia, actúe seleccionando de algún modo los espermatozoides más aptos para alcanzar el éxito de la fecundación.

#### 4.2. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HETERÓLOGA

El apartado correspondiente al estudio de las interacciones espermatozoide-ovocito a nivel heterólogo nos ha permitido profundizar en algunos aspectos que hasta ahora habían dado lugar a resultados contradictorios en la bibliografía. Nuestros resultados demuestran hallazgos novedosos que cuestionan algunas de las ideas clásicas de los mecanismos de la fecundación, aunque previamente algunos investigadores ya habían puesto en tela de juicio tales dogmas.

##### 4.2.1. Los espermatozoides humanos son capaces de adherirse a la zona pelúcida porcina y sufrir la reacción acrosómica

La zona pelúcida clásicamente ha sido considerada como el lugar donde residía la especificidad de especie en los procesos de fecundación en mamíferos (Yanagimachi, 1994; Hanada y Chang, 1972). En la mayoría de especies, determinadas cadenas de oligosacáridos de la ZP y sus correspondientes carbohidratos unidos a proteínas, a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide, se consideran responsables de mediar en la unión específica y el reconocimiento entre el espermatozoide y la ZP (Bedford, 1977; Hoshiba y Sinowatz, 1998; Sinowatz y cols., 1998).

A pesar de ello, diferentes autores han demostrado que la unión de los espermatozoides a la ZP no es estrictamente específica de especie, aunque dicha estructura representa una barrera significativa para la mayoría de cruces *in vitro* (Wassarman y cols., 2005), donde su función adquiere mayor importancia.

Nuestros resultados demuestran que los espermatozoides humanos pueden unirse a la ZP de ovocitos porcinos madurados *in vitro*.

Además, la inducción de la RA consecuencia de dicha unión, que se observó en los espermatozoides humanos que se incubaron con ovocitos completos durante 2'5 horas, indica que se trata de un tipo de unión activa que desencadena la RA. Estos resultados, aunque aún preliminares, abren la posibilidad de utilizar en un futuro próximo ovocitos porcinos madurados *in vitro* para el estudio de la funcionalidad espermática humana, si se demuestra que existe una buena correlación con los resultados de fertilidad.

La unión no específica de especie entre espermatozoides y ovocitos mostrada en este trabajo no es la única referencia existente de unión heteróloga espermatozoide-ZP, aunque es la primera vez que se utiliza con la finalidad de estudiar la funcionalidad de espermatozoides humanos. En la especie humana, Lee y cols., (1987) obtuvieron inducción de la RA utilizando ZP de ratón solubilizada mediante ácidos, atribuyendo este efecto a la presencia de factores a nivel de la ZP de ratón que provocaron una estimulación heteróloga. Oehninger y cols., (1993) comprobaron la inducción de la RA en espermatozoides humanos utilizando ZP homóloga (humana) y ZP de origen heterólogo (*cynomolgus* monkey y hámster), destacando que a pesar de que los valores obtenidos con ZP heteróloga fueron inferiores, se producía una inducción de la RA con zona pelúcida de origen heterólogo.

Otros autores como O´Rand y colaboradores (1985) y Naz y cols. (1991) han propuesto que determinadas proteínas de la ZP porcina podrían tener capacidad para unirse a las proteínas del espermatozoide humano. Windt y cols. (1992) observaron que cuando añadían ZP solubilizada al medio de fecundación, se producía un aumento en el número de espermatozoides unidos a la ZP en comparación al control, sugiriendo que las proteínas de la ZP porcina previenen la inducción de la RA en los espermatozoides humanos lo cual no está en

concordancia con nuestros resultados, ni con los obtenidos por O'Rand y cols. (1985) y Naz y cols. (1991).

Más recientemente Delle Monache (2003) ha demostrado la existencia de una molécula denominada "Gp273" (que actúa como ligando del espermatozoide en la interacción de gametos en un molusco bivalvo) que se une a los espermatozoides humanos e induce la reacción acrosómica. Este resultado es otra evidencia más de que no existe una estricta especificidad de especie, al menos a nivel de la unión primaria espermatozoide-ZP, lo cual ya fue propuesto por Focarelli y cols., (2001) y concuerda con nuestros resultados. Aunque en la especie humana, diferentes trabajos han estudiado la interacción heteróloga utilizando espermatozoides humanos y ZP porcina, éstos no han obtenido inducción de la RA. Sin embargo, existen trabajos recientes que demuestran unión e inducción heteróloga, por ejemplo utilizando ZP bovina y espermatozoides porcinos y equinos (Sinowatz y cols., 2003), lo cual tampoco había sido obtenido previamente.

La posibilidad de que la inducción de la RA observada en nuestros resultados sea consecuencia de la acción de la progesterona producida por las células del *cumulus oophorus* de los ovocitos se descarta porque se utilizaron ovocitos desnudos antes de la incubación con los espermatozoides.

Una de las posibles explicaciones a que determinados autores no hayan observado, en muchos casos, inducción heteróloga de la RA, puede ser debido al uso de ZP solubilizada. Ha sido demostrado que cuando se utiliza ZP solubilizada, incluso de origen homólogo, los porcentajes de inducción de RA en comparación con ZP intacta son menores (24 vs. 45%, Cross y cols., 1988; 26 vs. 84%, Baastian y cols., 2002). Aunque la causa exacta de estas diferencias no se conoce totalmente, puede ser debido a la pérdida de la estructura de la ZP que se produce durante el proceso de solubilización, cuya disposición tridimensional presenta una gran complejidad (Green, 1997), alterándose la disposición en que se encuentran los terminales responsables de la unión e inducción de la RA.

Además, ha sido demostrado que la cantidad de proteína solubilizada necesaria, incluso de origen homólogo, supera en la mayoría de los casos la concentración de 1ZP/ $\mu$ l para obtener porcentajes de inducción de RA significativos (hámster: Cherr, y cols., 1986; humano: Schuffner y cols., 2002; bovino: datos propios, no publicados), lo que implica necesariamente el uso de grandes cantidades de proteína cuya obtención es bastante laboriosa.

Otro aspecto a tener en cuenta es el sistema para la evaluación de la RA. En nuestros experimentos se utilizó un método específico de espermatozoides humanos descrito por Liu y Baker (1996), útil para trabajar cuando el número de espermatozoides sobre los que se hace la evaluación de la RA es muy limitado, evitando cualquier pérdida de muestra.

Los datos existentes sobre la composición de la ZP porcina demuestran que existe un alto porcentaje de homología, a nivel de ZP3, entre ZP porcina y humana, que según Zhu y Naz (1999) cifran en el 78´9%, si bien es cierto que la especificidad de especie y la capacidad de unión puede residir tan solo en unos pocos residuos glucídicos. El modelo que se propone es que numerosas moléculas participan en el proceso de interacción e inducción. De hecho, existen numerosos trabajos en la bibliografía sobre diferentes moléculas que aún habiendo sido demostrada su implicación en el proceso, no provocan una inhibición total de la interacción cuando se eliminan, lo que justifica la participación de varias moléculas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las referencias bibliográficas relacionadas que existen, se puede concluir que bajo condiciones *in vitro* la especificidad de especie de las interacciones espermatozoide-ZP es menos restrictiva de lo que se preveía, quizás debido a la falta del efecto de las secreciones oviductales, tal y como propusieron Slavik y Fulka (1999) y teniendo en cuenta que según algunos autores (revisado por Clark y Dell, 2006) la función de los oligosacáridos de la ZP es precisamente el establecimiento de la especificidad de especie. Por el contrario, la interacción con el oolema se demostró

ser más restrictiva de lo esperado, ya que previamente se ha descrito en numerosas ocasiones la penetración heteróloga en ovocitos porcinos sin ZP (Gardon y cols., 2001; Zhao y cols., 2002).

De hecho en las experiencias del bloque I (en las que se estudió el efecto de las secreciones oviductales sobre la interacción espermatozoide-ovocito homóloga en porcino y bovino), los resultados demuestran que cuando los ovocitos han estado en contacto con las secreciones oviductales (*in vitro*), los resultados de FIV muestran porcentajes de monospermia más altos, mientras que el número de espermatozoides por ovocito disminuye considerablemente, lo que demuestra que las secreciones oviductales intervienen de algún modo bloqueando la capacidad de unión de los espermatozoides a la ZP.

La unión del espermatozoide a la ZP refleja múltiples funciones del gameto masculino; por lo tanto, un test diagnóstico que evalúe la habilidad de los espermatozoides para sufrir la RA como respuesta al estímulo de la unión a ZP, es una herramienta útil en el estudio de la fertilidad masculina (Franken y cols., 1990; Oehninger y cols., 2000; Liu y Baker, 1992). Es por ello que el uso de ZP porcina heteróloga tal y como se describe en este trabajo puede ser una opción como test diagnóstico, siendo más viable desde el punto de vista de la obtención del material biológico, una vez demostrado que es posible la interacción heteróloga.

#### 4.2.2. Los espermatozoides humanos son incapaces de atravesar la membrana plasmática de los ovocitos porcinos

En la interacción espermatozoide-ovocito, una vez superada la zona pelúcida o tras su eliminación, la membrana plasmática representa la siguiente barrera. La interacción del espermatozoide, en concreto su membrana acrosomal interna, con la membrana del ovocito (ooplasma) supone una adhesión celular firme que culmina con la fusión de ambas membranas. El mecanismo de fusión no se conoce totalmente, pero se han identificado diferentes moléculas que están

implicadas, como "CRISP 1" y moléculas tipo "ADAM'S" en el espermatozoide, e integrinas y otras proteínas asociadas a integrinas en el ovocito (Evans, 2002). Mientras que la primera barrera, la zona pelúcida, es reconocida en muchos casos como una eficiente barrera específica de especie (Yanagimachi, 1994; Hanada y Chang, 1972), la existencia de mecanismos de especificidad de especie a nivel de las interacciones entre membranas de gametos en mamíferos no es tan evidente.

Nuestros resultados demuestran que los espermatozoides humanos capacitados pueden unirse a la membrana plasmática de ovocitos porcinos madurados *in vitro* sin ZP, pero no son capaces de fusionarse con ella y penetrar al interior. Utilizando diferentes métodos de inducción de RA con agonistas naturales (progesterona y fluido folicular) y artificiales (ionóforo), los espermatozoides con RA inducida tampoco son capaces de fusionarse con el oolema de los ovocitos porcinos sin ZP. Descartamos que los resultados en los que falló la penetración se deban a las condiciones de fecundación, porque se realizaron controles con inseminación de ovocitos porcinos y espermatozoides homólogos en los que la fecundación alcanzó el 100% de penetración.

Sin embargo, la unión y penetración heteróloga entre espermatozoides y ovocitos sin ZP ha sido demostrada por numerosos autores usando diferentes combinaciones de espermatozoides y ovocitos de varias especies de mamíferos (Bedford, 1977; Yoshimatsu y cols., 1988; Liu y cols., 1991; Lanzendorf y cols., 1992 y Oehninger y cols., 1993). El caso más extremo y extendido es la utilización de ovocitos de hámster sin ZP por su capacidad de ser penetrados por espermatozoides de numerosas especies animales, siendo una práctica extendida desde los años 70, utilizada para evaluar su capacidad fecundante (Yanagimachi, 1976). En estudios realizados *in vitro* se observa que de forma general, los ovocitos de mamíferos sin ZP tienden a fusionarse, al menos con espermatozoides de la misma especie o de especies cercanas.

No obstante, se han descrito algunos casos de incompatibilidad a nivel de interacción entre membranas, espermatozoide-oolema, incluso entre especies próximas dentro de los rumiantes, como por ejemplo entre espermatozoides de antílope y ovocitos de vaca (Kouba y cols., 2001), no siendo esa incompatibilidad en todos los casos recíproca (es decir que no existe incompatibilidad entre espermatozoides de toro y ovocitos de antílope). En el caso de espermatozoides humanos ha sido descrita la falta de fusión con ovocitos libres de ZP de rata o ratón (Hanada y Chang, 1978; Quinn, 1979; Pavlok, 1980), especies filogenéticamente próximas al hámster.

De los datos existentes en la bibliografía y de los nuestros propios, además de la opinión del Profesor Yanagimachi (comunicación personal), puede ser inferido que la fusión entre gametos a nivel de membranas plasmáticas de diferentes especies es impredecible, no cumpliendo ninguna regla conocida, y que son necesarios ensayos específicos para conocer los resultados en cada combinación entre gametos de diferentes especies.

#### 4.2.3. Los espermatozoides humanos pueden descondensarse y formar un pronúcleo masculino cuando son inyectados en el citoplasma de ovocitos porcinos

Una vez que el espermatozoide ha sido capaz de atravesar las barreras que protegen al ovocito, se debe producir la descondensación de la cromatina y formación del pronúcleo masculino como paso previo a la formación del cigoto. Numerosos ensayos han sido diseñados para estudiar la capacidad fecundante de los espermatozoides en general, y de los espermatozoides humanos en particular. Uno de los más completos es el test de penetración utilizando ovocitos de hámster, pero sin embargo este tipo de test solo llega a valorar la capacidad del espermatozoide para penetrar en el ovocito y no evalúa la capacidad de formación del pronúcleo masculino y femenino consecuencia de la activación del ovocito.

Debido a la importancia que tienen en la fecundación los eventos que se producen tras la penetración del espermatozoide, diferentes grupos de investigadores han desarrollado sistemas de microinyección espermática heteróloga, empleando ovocitos de diferentes especies, principalmente roedores, para estudiar dichos eventos. Por ejemplo, Lee y cols. (1996) utilizaron ovocitos de ratón para realizar ICSI con espermatozoides humanos y analizar la constitución cromosómica de dichos espermatozoides. Ahmadi y cols. (1996) utilizaron un ensayo de ICSI heteróloga con ovocitos de hámster y espermatozoides humanos como test de funcionalidad espermática para casos de infertilidad con factor masculino severo. Recientemente, Terada y cols. (2004) propusieron que la evaluación de la funcionalidad del centrosoma durante el primer ciclo celular podía ser un importante parámetro a tener en cuenta para evaluar la habilidad global del espermatozoide en el proceso de fecundación.

La utilización de ovocitos de roedores para los ensayos de ICSI heteróloga con espermatozoides humanos tiene un problema, y es que los roedores adquieren el centrosoma de la madre, siendo una rara excepción entre los mamíferos, mientras que de forma general y en el caso de los humanos concretamente también, el centrosoma es aportado por la vía paterna (por el espermatozoide). En consecuencia, los ensayos heterólogos con ovocitos de hámster no son apropiados para examinar la actividad del centrosoma de ovocitos humanos (Hewitson y cols., 1997) y de otras especies de mamíferos donde el centrosoma venga aportado por la vía paterna.

A pesar de que la habilidad de los espermatozoides humanos para formar un pronúcleo masculino tras la ICSI en un ovocito porcino ya fue demostrada por Kim y cols. (1999), el uso de este ensayo como una nueva herramienta para evaluar la funcionalidad espermática no ha sido planteado anteriormente. En la referencia citada anteriormente, los autores obtuvieron altos porcentajes de activación de ovocitos y de formación pronuclear, lo cual concuerda con los datos obtenidos en el presente trabajo para las muestras procedentes de donantes sanos. Sin embargo, estos autores al evaluar los resultados a las 18-20 horas

post-ICSI no observan divisiones del ovocito, a diferencia de lo observado en nuestros resultados, donde se observaron divisiones en las muestras de semen de donantes sanos, mientras que en las muestras de pacientes con diferentes patologías no se observó. Las posibles diferencias entre los medios de cultivo utilizados por Kim y cols. (1999) y los empleados en este estudio, para la incubación de los ovocitos después de la ICSI pueden ser una de las causas que explique la diferencia en la observación de divisiones, teniendo en cuenta que García-Rosello y cols. (2006) demostraron un efecto positivo sobre la división causado por el medio TALP (medio utilizado en el presente estudio) en comparación al NCSU-23 (medio utilizado por Kim y cols., 1999).

Los distintos porcentajes de formación pronuclear y de división observados después de la microinyección de espermatozoides humanos, con una clara diferencia para la variable división según el origen de las muestras, sugiere que las diferencias podrían deberse a la diferente capacidad fecundante de las muestras, abriendo una posibilidad para el desarrollo de nuevos test de funcionalidad espermática. Además el sistema de ICSI heteróloga descrito en la metodología, puede ser también útil para el estudio de la capacidad de activación del ovocito utilizando una muestra de semen humano o para la evaluación de la funcionalidad del centrosoma. Para ello será necesario, en el futuro, desarrollar este modelo utilizando un gran número de paciente provenientes de diferentes centros de infertilidad, que permita agruparlos por etiologías y con los que sea posible demostrar las correlaciones existentes con los resultados finales de fecundación.



## 5. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con DTSP de ovocitos madurados *in vitro* provoca un aumento del tiempo de digestión con pronasa de la ZP (endurecimiento), tanto en la especie porcina como en la bovina.

2. El endurecimiento de la ZP causado por el DTSP afecta a los resultados de FIV, causando una disminución de la polispermia. En la especie porcina este efecto es dosis-dependiente y a determinadas concentraciones provoca además un aumento del rendimiento final.

3. Los ovocitos porcinos y bovinos madurados *in vitro* y los ovocitos de folículos preovulatorios presentan tiempos de digestión con pronasa (endurecimiento) muy inferiores a los ovocitos ovulados.

4. La incubación de ovocitos porcinos, madurados *in vitro*, en fluido oviductal provoca un endurecimiento de la ZP comparable al observado en ovocitos ovulados. Para los ovocitos bovinos, la incubación bajo las mismas condiciones provoca un notable endurecimiento, pero inferior al observado para ovocitos ovulados.

5. El endurecimiento provocado tras la incubación en fluido oviductal, sobre los ovocitos madurados *in vitro*, es parcialmente reversible a lo largo del tiempo, cuando los ovocitos se incuban en medio de fecundación tras haber sido tratados con dicho fluido.

6. El endurecimiento de la ZP causado por el fluido oviductal afecta a los resultados de FIV porcina, mejorando el porcentaje de monospermia y el rendimiento final. De ello se deduce que el fluido oviductal influye en la interacción espermatozoide-ovocito homóloga en la especie porcina.

**7.** La interacción entre espermatozoide humano y zona pelúcida porcina no es estrictamente específica de especie, pudiendo unirse espermatozoides humanos a la ZP porcina. Esta unión conlleva inducción de la RA.

**8.** El porcentaje de inducción de la RA provocado tras la interacción de espermatozoides humanos con la ZP porcina varía dependiendo de la muestra seminal utilizada.

**9.** Los espermatozoides humanos, con o sin RA inducida, no pueden penetrar ovocitos porcinos madurados *in vitro* sin ZP.

**10.** La microinyección de espermatozoides humanos en ovocitos porcinos madurados *in vitro* provoca la activación del ovocito, la descondensación de la cabeza espermática, la formación de pronúcleos y en muestras de donantes de fertilidad probada la división celular.