

## 6. RESUMEN

Como fruto de la interacción de dos células totalmente diferenciadas, la fecundación permite obtener un cigoto totipotente capaz de formar todos los tipos celulares del organismo. Debido a la complejidad de este proceso biológico, y a pesar de la importancia que tiene el control de la fecundación, los mecanismos implicados en la unión de gametos continúan sin conocerse de forma completa.

La unión del espermatozoide y el ovocito es tan sólo una parte del complejo proceso de la fecundación, la cual es crítica para el éxito de la misma. Máxima relevancia adquiere esta etapa bajo condiciones *in vitro*, donde algunas de las barreras presentes en condiciones *in vivo* han sido eliminadas. En estos casos la interacción entre los gametos se reduce a tres niveles principalmente: zona pelúcida (ZP), membrana plasmática y citoplasma.

La unión del espermatozoide a la ZP, presenta grandes restricciones de especie y responde a un complejo mecanismo que no se conoce en su totalidad, habiéndose descrito casos en los que no existe una estricta especificidad de especie. Además, la ZP se considera una de las barreras defensivas más importantes del ovocito y del embrión, tanto frente a los agentes externos como a los espermatozoides. Sin embargo, bajo condiciones *in vitro*, en algunos casos como en la especie porcina, se observa una deficiente función defensiva de la ZP frente a la entrada de espermatozoides, produciéndose polispermia, cuyas consecuencias suelen ser la formación de un embrión no viable.

En base a estas dos razones principales (falta de especificidad de especie de la ZP en determinados casos y fallo de la función defensiva frente a la entrada de espermatozoides) se considera de interés el estudio de la interacción espermatozoide-ovocito a nivel homólogo en dos especies con diferente incidencia de polispermia, porcina y bovina, y a nivel heterólogo entre la especie humana y la porcina por el interés clínico de sus aplicaciones.

Los objetivos de este estudio son profundizar en el conocimiento de: i) los mecanismos implicados en la interacción homóloga espermatozoide-ovocito, con el fin de mejorar los resultados de fecundación *in vitro* (FIV), disminuyendo la polispermia en las especies porcina y bovina, y ii) la interacción heteróloga entre gametos, con el fin de desarrollar nuevas pruebas de evaluación de la funcionalidad espermática humana, mediante el uso de ovocitos de animales de la especie porcina.

Para ello se plantean una serie de experimentos distribuidos en dos bloques: estudio de las interacciones entre gametos homólogos y entre gametos heterólogos.

En la primera parte, correspondiente a interacciones entre gametos de la misma especie (homólogos) se pretende provocar modificaciones en la ZP (utilizando agentes químicos y sustancias biológicas), y comprobar si afectan a la interacción espermatozoide-ovocito homóloga. Se utilizan para ello gametos de dos especies, porcina y bovina, en las que típicamente los índices de polispermia son distintos, altos en el primer caso y notablemente inferiores en el caso de la especie bovina.

En los experimentos del 1 al 5, los ovocitos madurados *in vitro* de cerda y vaca se incuban con una sustancia química (DTSP), que favorece la formación de puentes entre las aminas de las proteínas y se valora el grado de endurecimiento (tiempo de digestión con proteasa) que ejerce y el efecto causado sobre la FIV.

Los resultados demuestran que el tratamiento con DTSP provoca un endurecimiento de la ZP en ambas especies, obteniéndose valores de 3743 segundos en el cerdo y de 1777 segundos en la vaca, frente a los 60-120 segundos de los grupos control. En cuanto al efecto sobre la FIV, para la especie porcina el tratamiento provocó un notable aumento del porcentaje de monospermia frente al grupo control (50% vs 5%), y por consiguiente una disminución de la polispermia, además de un incremento del rendimiento final de

la fecundación (47% vs. 5%). En la especie bovina se obtuvo un ligero aumento del porcentaje de monospermia (64%) frente al control (54%), pero este no conllevó mejora del rendimiento (37% vs. 50%) debido a que la penetración disminuye de forma leve.

Para estudiar el efecto *in vitro* del fluido oviductal sobre la ZP, en los experimentos del 6 al 10 se incubaron ovocitos madurados *in vitro* de porcino y bovino en fluido oviductal y se valoró el efecto que producía sobre la ZP, su endurecimiento y la duración del mismo a lo largo del tiempo. Además se realizó FIV con ovocitos porcinos expuestos al fluido oviductal y se comprobó su efecto sobre la FIV.

Los resultados demuestran que el tratamiento con fluido oviductal provoca un aumento del tiempo de digestión con pronasa (endurecimiento) muy notable de la ZP porcina (12.657 s), con tiempos similares a los obtenidos para ovocitos porcinos ovulados (13.960 s). En bovino también ejerce un notable endurecimiento de la ZP (4.300 s), pero con tiempos de digestión inferiores a los observados en ovocitos bovinos ovulados (31.448 s). Además se comprueba que tras la incubación en el fluido oviductal, cuando los ovocitos se mantienen en un medio de fecundación, transcurridos 15 minutos el endurecimiento ya ha disminuido notablemente, tanto en porcino (2.737 s) como en bovino (2.843 s), aunque transcurridas 5 horas aún el tiempo de digestión con pronasa es superior al del grupo control (porcino, 675 vs 63 s; bovino 1037 vs 102 s).

En cuanto a los resultados de FIV porcina con ovocitos expuestos al fluido oviductal, se observa un notable aumento de los índices de monospermia frente al grupo control (29% vs. 8%) y del rendimiento final (25% vs. 8%). Estos resultados sugieren que una de las causas de los altos índices de polispermia observados en la FIV de porcino, puede relacionarse con el hecho de que los ovocitos madurados *in vitro* no permanecen en contacto con las secreciones oviductales, a diferencia de lo que ocurre *in vivo*.

En el segundo bloque, teniendo en cuenta las limitaciones éticas que plantea el uso de gametos humanos, y en aras de profundizar en el conocimiento de la interacción heteróloga de gametos y sus aplicaciones, se plantea el estudio de la interacción heteróloga entre espermatozoides humanos y ovocitos porcinos. Para ello se estudia la interacción a nivel de la ZP, la membrana plasmática y el citoplasma, por ser las tres barreras a las que se reduce la interacción de gametos *in vitro*.

Para estudiar la interacción a nivel de ZP se valora la capacidad de unión de los espermatozoides humanos y la inducción de la reacción acrosómica (RA) tras dicha unión, utilizando ovocitos porcinos con ZP. El resultado demuestra que un reducido número de espermatozoides pueden unirse a la ZP y que dicha unión induce la RA con valores entre el 15% y el 58%, dependiendo de la muestra.

Respecto a la interacción con la membrana plasmática, se estudia la capacidad de los espermatozoides humanos de penetrar los ovocitos porcinos desprovistos de ZP. Los espermatozoides humanos utilizados son capacitados previamente y en algunos de los grupos, se induce la RA utilizando diferentes sustancias (fluido folicular porcino,  $P_4$  o ionóforo de  $Ca^{2+}$ ). Tras la incubación de espermatozoides y ovocitos (20-22 h), se evalúa la penetración. Los resultados demostraron que bajo las condiciones utilizadas, los espermatozoides humanos no pueden penetrar los ovocitos porcinos sin ZP, y que los ovocitos no sufren el proceso de activación, tal y como demuestra el hecho de que el núcleo de los ovocitos continúa en estadio de metafase. En los grupos control, bajo las mismas condiciones, se observó penetración homóloga (ovocitos y espermatozoides porcinos) en altos porcentajes (86-98%).

A continuación se estudia la interacción del espermatozoide humano y el ooplasma porcino. En los ovocitos porcinos madurados *in vitro* se introduce un espermatozoide humano, utilizando la técnica de microinyección espermática. A continuación los ovocitos microinyectados se incuban en un medio de FIV durante 20-22 horas, tras lo cual se fijan y tiñen para evaluar el porcentaje de división y el

estado del núcleo del ovocito y del espermatozoide. Los resultados demuestran que tras la microinyección del espermatozoide humano, se produce la activación del ovocito porcino y la descondensación de la cabeza espermática, pudiendo llegar a formarse pronúcleos masculino y femenino, observando diferencias importantes en el porcentaje de división a las 22 horas, según el origen de las muestras seminales.

## 7. SUMMARY

Fertilisation is a complex process where two completely differentiated cells become a totipotent zygote that can produce any type of cell in the organism. Due to its huge complexity, there is a lack of knowledge about different mechanisms involved in the sperm-oocyte interaction. Such interaction is just a step in the fertilisation process, but critical for its success.

For example, at the sperm-zona pellucida binding level, there is a kind of species-specificity, but it remains to be determined when and why such specificity occurs because the rules are not always followed when gametes from different species meet. On the other side, the zona pellucida is considered a defensive barrier to prevent the entrance of additional spermatozoa into the oocyte. However, under in vitro conditions, this mechanism does not work in some species such as the porcine and the resulting polyspermy produce non-viable embryos.

Because of these two reasons (lack of species-specificity in some situations and failures in the block to polyspermy in some others) the aim of this study was to deepen the knowledge of the homologous and heterologous sperm-oocyte interaction by using porcine, bovine and human gametes as models. This was approached by i) studying the homologous sperm-zona pellucida interaction in pigs and cows with the objective of improving the levels of monospermy after in vitro fertilisation (IVF) and, ii) studying the heterologous interaction between human spermatozoa and pig oocytes at zona pellucida, oolema and ooplasm levels with the objective of developing a test to predict the fertilising ability of human sperm.

In the first series of experiments, we tried to modify the porcine and bovine zona pellucida by means of chemical or biological agents in order to make it harder, or more resistant to protease digestion. In such way, it was predictable that the levels of polyspermy became reduced. Pig was used as an example of a

species with high levels of polyspermy at in vitro fertilisation while cow was used as an example of low level of polyspermy after IVF.

Experiments 1 to 5 aimed to evaluate the effect of the chemical reagent DTSP, that crosslinks the proteins by reacting with primary amines to form stable amide bonds. Zona pellucida hardening and IVF results were assessed in pig and cow species. The results showed that DTSP makes the ZP harder in both cases, giving 3743 sec in pig and 1777 sec in cow after 30 min of contact with the oocytes, compared to 60-120 sec for the control groups. Regarding pig IVF, DTSP treatment produced a huge increase in the percentage of monospermy compared to the control group (50% vs 5%), without decreasing the percentage of penetration. On the contrary, in cow IVF, DTSP produced a slight increase in the percentage of monospermy (64% vs 54%) with a further decrease in the percentage of penetration (58% vs 92%), thus rendering the final output of the technique lower.

In order to test a biological agent, pig or cow in vitro matured oocytes were incubated for 30 min with bovine oviductal fluid in experiments 6 to 10. The results showed that the porcine ZP took 12657 sec to be digested with pronase after the treatment, whereas the bovine ZP took 4300 sec. Control oocytes recovered from oviduct s took 13960 sec and 31448 sec, respectively, for pig and cow, whereas the control IVM oocytes took 60-120 sec. Moreover, a reversibility of this effect was observed in both species when oocytes incubated in oviductal fluid were transferred to IVF medium, being the digestion times after only 15 min 2737 sec and 2843 sec for pig and cow oocytes, respectively. After 5 hours in IVF medium, the digestion times dropped to 675 and 1037 sec for pig and cow oocytes.

IVF results were significantly improved in pig after treatment with oviductal fluid, with a monospermy level of 29% compared to 8% in control group (under saturated sperm conditions). These results suggest that one of the reasons for the high levels of polyspermy under *in vitro* conditions can be the lack of contact with

oviductal secretions, which is necessary to make the oocyte ZP harder and help in the prevention of polyspermy.

Experiments 11 to 14 studied the human sperm-pig oocyte interaction at the ZP, oolema and ooplasm levels. After 2.5 h coincubation, the ability of human sperm to bind to the pig ZP was assessed as well as the percentage of acrosome reaction in the bound sperm. The results showed that a reduced number of spermatozoa can bind the ZP and such binding induce acrosome reaction in 15 to 58% of spermatozoa depending on the individual sample.

To evaluate the interaction with the oocyte plasma membrane, human sperm and pig zona-free oocytes were incubated in IVF medium for 20-22 hours. The sperm were previously capacitated and, in some groups, the acrosome reaction was induced with follicular fluid, progesterone or calcium ionophore. The results showed that human spermatozoa are unable to penetrate pig zona-free oocytes and that pig oocytes are not activated by contact with human sperm, remaining at Metaphase II stage. Control groups under the same conditions showed 86-98% homologous penetration (pig oocytes with pig spermatozoa).

Finally, the interaction between human sperm and pig ooplasm was studied by ICSI (intracytoplasmic sperm injection). The results showed that human sperm can develop to male pronucleus when they are injected into pig oocytes and can activate the oocyte, since female pronucleus was also observed. Moreover, sperm samples coming from healthy donors were able to produce two cell developmental stage-zygotes.