



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
Departamento de Fisiología

**Interacciones homólogas y heterólogas *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos, y sus aplicaciones en el estudio de la fecundación**

Sebastián Cánovas Bernabé

**2007**



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Fisiología

**Interacciones homólogas y heterólogas *in vitro* de gametos porcinos, bovinos y humanos, y sus aplicaciones en el estudio de la fecundación**

Sebastián Cánovas Bernabé

Murcia, 2007

*A mi abuela,  
que nunca la olvidaré.*

*A mis padres,  
por hacerme feliz.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En este momento, una vez plasmados en papel los resultados del trabajo científico, me queda una labor no menos ardua que consiste en agradecer la ayuda y apoyo prestado durante estos cuatro años. Resumir en pocas líneas lo que siento en este momento después de cuatro años de vivencias es un objetivo inalcanzable, si bien intentaré manifestar mi agradecimiento a todos los que han colaborado a que este proyecto fructifique, lo cual me ha hecho crecer a nivel personal y profesional.

A mi directora Pilar Coy, excelente investigadora y persona, entusiasta en su trabajo y firme en sus convicciones, quien me brindó la oportunidad de llevar a cabo uno de mis sueños, conocer el mundo de la investigación. Cada resultado sorprendente era motivo para una desorbitada emoción que impregnaba el ambiente de optimismo e inquietud para continuar.

A mi director Emilio Gómez, admirable profesional que hizo posible el desarrollo de gran parte de este proyecto, vinculando estrechamente su labor clínica con su afán investigador.

Al profesor Manuel Avilés, de quien tanto he aprendido tanto en lo profesional como en lo personal. Fue quién me hizo descubrir el mundo de la ZP (zona pelúcida), para acabar siendo un esclavo científico de tan honrada estructura. Su inquietud por la investigación es una cualidad admirable de su persona.

A los profesores Salvador Ruiz y Carmen Matás, mi más sincero agradecimiento por todo cuanto me enseñaron en mis inicios en el laboratorio y tantas otras cosas que descubrí gracias a ellos.

A Rakel Romar, por la ayuda prestada sin la cual hubiera sido imposible llegar a tiempo. Por el apoyo prestado en los momentos difíciles. Gracias por todo.

A Joaquín Gadea, por su disponibilidad y ayuda en todo momento, desde que me inicié en esta aventura, allá por el verano del 2002 con la tramitación de los documentos de la beca, hasta el día de hoy. Un gran científico y gran persona. No cambies Joaquín.

A todos los compañeros con los que compartí mi trabajo en el laboratorio a lo largo de estos años: Fran, Empar, Manolo, David, Guillermo, Patricia, Luis y Marco. Hubieron buenos momentos y otros no tan buenos, pero solo recordaré los buenos. Espero que todos alcancéis los objetivos propuestos.

A Juan Antonio Carvajal y a Soledad Rodríguez, por su labor de apoyo en el día a día del laboratorio.

Al IVI-Murcia por la ayuda y el apoyo institucional prestados para el desarrollo de este trabajo. A Elena Sellés, Marta Mollá, Juan Carlos Martínez y Julián Marcos del equipo IVI-Murcia, por su colaboración en la recogida de las muestras seminales.

A todos los que se han incorporado a formar parte de ese gran grupo "Fisiovet": Cesar, Karen, Maria Dolores, Aitor, Ángeles; espero que disfrutéis tanto como yo lo hice, trabajando y aprendido.

Al Dr. Detlef Rath, por brindarme la oportunidad de conocer Mariensee y su formidable centro de investigación. Al Dr. Hunter por su labor de revisión en las publicaciones derivadas de esta investigación.

A las instituciones que permitieron el desarrollo de este proyecto y las empresas que prestaron su colaboración para el desarrollo del mismo, tales como El Pozo, Matadero Cabezo de La Plata y MercaMurcia.

A mis padres Pedro e Isabel, quienes me han enseñado todo lo que se y es realmente importante en la vida, aquello que no se aprende en un aula o en una biblioteca. Me enseñasteis a andar, a comer, a hablar, a querer, a leer, a reír y a soñar. Me habeis demostrado que con esfuerzo y tesón todo es posible y esa será mi doctrina. Vuestra confianza y apoyo, ha sido una variable constante en todo momento. Espero no defraudaros.

Gracias a mis hermanos Fulgen, Lucy y Pedro, que siempre han confiado en mí, y me han brindado su cariño y ayuda tan necesaria en los momentos difíciles. A mi sobrina Silvia, que como un ángel inunda de felicidad su alrededor.

A Mari Carmen, por confiar en mí desde que inicié esta "aventura", apostando que llegaría a buen puerto. Por ser tan especial como eres. "Siempre consigues lo que te propones", ha sido tu frase de aliento en los momentos difíciles. Espero que juntos podamos seguir alcanzando objetivos.

A todos los que de uno u otro modo han colaborado en que esta Tesis sea una realidad, a la vez que han influido sobre mi, ayudándome a completar mi formación y haciéndome perder la inocencia. De todo se aprende.

*Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca gracias a una Beca de Formación de Personal Investigador (Programa Séneca 2002) y a través de los proyectos PB/15/FS/02 (Fundación Séneca) y AGL2003-03144 (Ministerio de Educación y Ciencia).*

## ÍNDICE

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

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

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

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

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

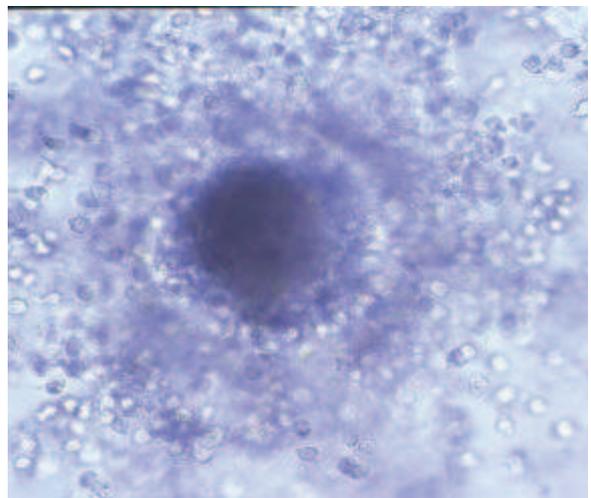
	Página
Experimento 10 .....	113
2.9.2. Bloque II: Interacción espermatozoide-ovocito heteróloga: Diseño de un modelo para el desarrollo de un test de funcionalidad espermática .....	113
2.9.2.1. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la ZP .....	113
Experimento 11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

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

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

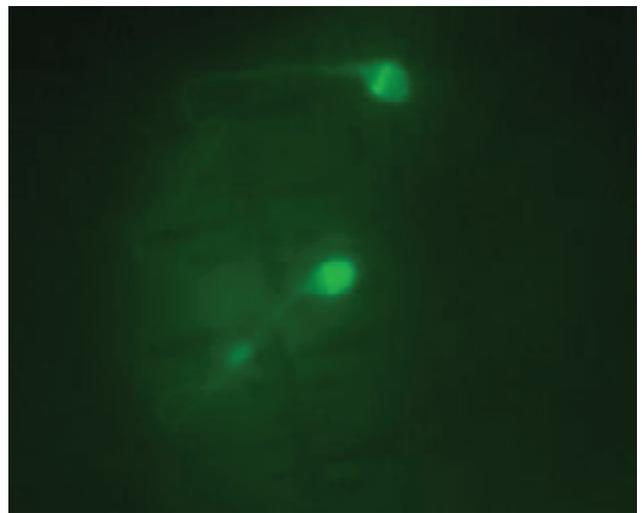
	Página
4.1.4. El tratamiento de los ovocitos bovinos con fluido oviductal incrementa de modo parcialmente reversible la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con proteasa .....	151
4.2. <u>INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO HETERÓLOGA</u> .....	153
4.2.1. Los espermatozoides humanos son capaces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

## *0. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS*





## *2. MATERIAL Y MÉTODOS*



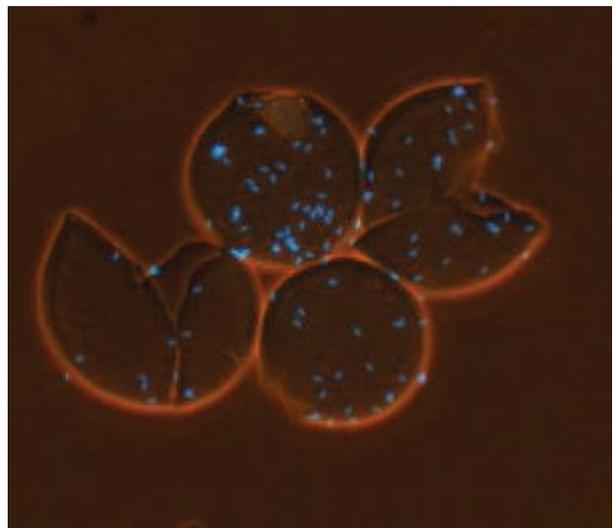
### 3. RESULTADOS



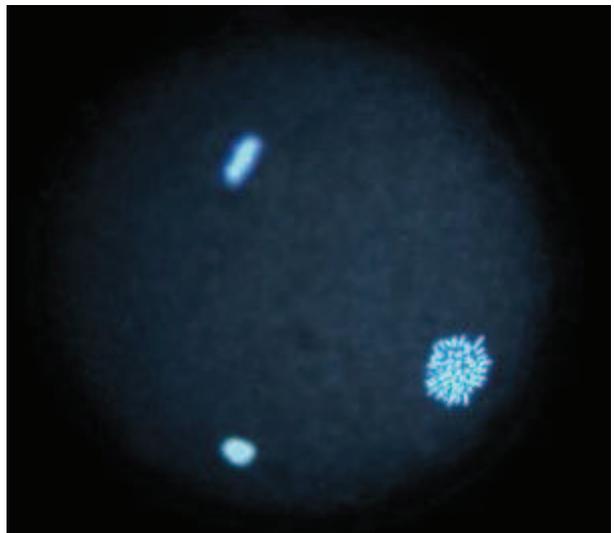
## 4. *DISCUSIÓN*



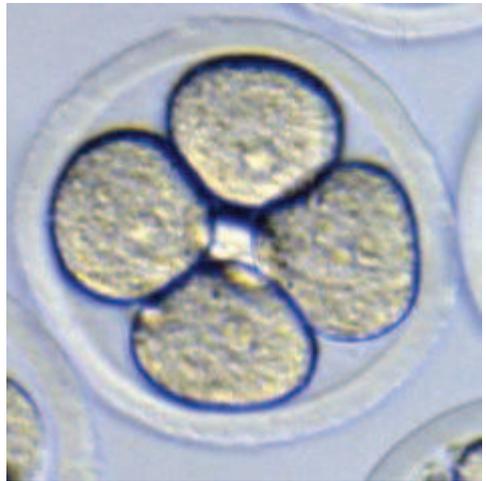
## *5. CONCLUSIONES*



## 6. RESUMEN



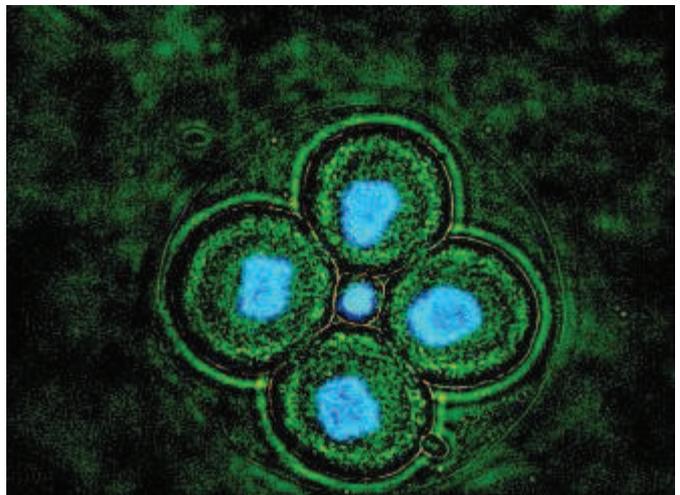
## *7. SUMMARY*



## ***8. ABREVIATURAS***



## 9. BIBLIOGRAFÍA



## *10. ANEXOS*



## 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 (Sinowitz, 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  $\text{Ca}^{2+}$  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,  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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- $\alpha$  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

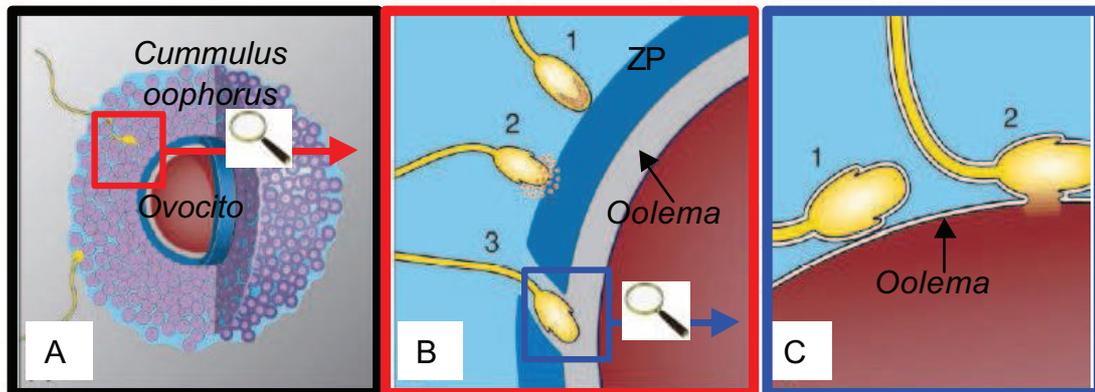
Una vez atravesadas las células del *cumulus oophorus*, el espermatozoide interacciona con el ovocito. Este proceso de interacción se produce a tres niveles: la ZP, que induce la exocitosis del contenido acrosomal, la membrana plasmática del ovocito, con la que se fusiona, y finalmente el citoplasma, 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 $\mu$ m en ratón, 13-16 en el cerdo, 20 $\mu$ m en la especie humana y 27 $\mu$ 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- $\beta$ -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- $\beta$ -galactosidasa, lo cual se debe tener en cuenta. Aunque la ZP1 porcina tratada con endo- $\beta$ -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 $\alpha$  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  $\beta$ -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).

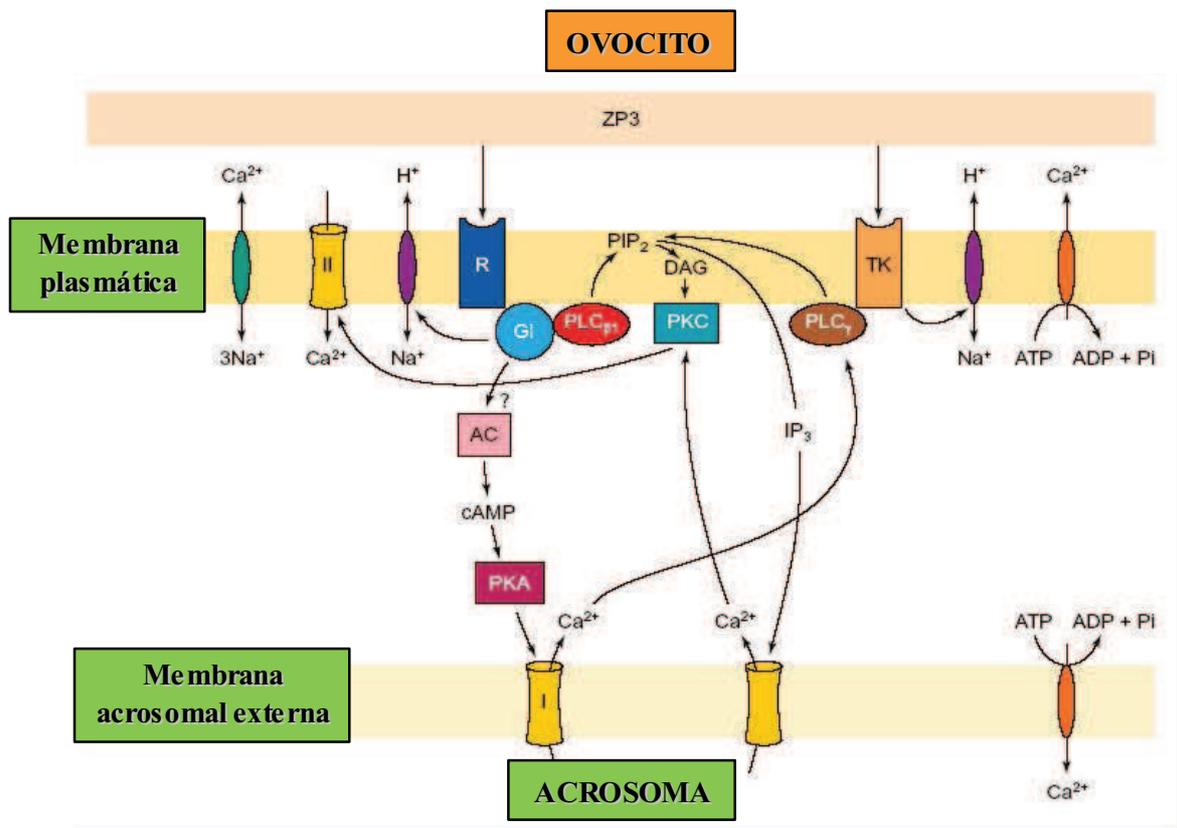
#### 1.1.3.1. Regulación del calcio intracelular durante la R.A.

Al igual que en las neuronas, células adrenales y otros sistemas de exocitosis, un aumento citosólico en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales iónicos de la membrana plasmática, ya que en las células de mamíferos, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\beta_1$  (PLC  $\beta_1$ ) y podría regular la actividad de la adenilato ciclasa (AC) para producir AMPc y activar la proteína-quinasa A (PKA). Esta PKA activaría un canal dependiente de calcio situado a nivel de la membrana acrosomal externa, que liberaría  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior del acrosoma hacia el citosol. Este es el primer aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, relativamente pequeño, el cual permite la activación de la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ).

La activación de las fosfolipasas PLC  $\beta_1$  (mediante la proteína G acoplada al receptor R) y la PLC $\gamma$  (mediante el ligero aumento de calcio por movilización desde el acrosoma), generaría la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para formar inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG).

La PKA y el IP<sub>3</sub> activarían los canales de Ca<sup>2+</sup> 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 PIP<sub>2</sub>) activa la PKC, la cual provoca la apertura de los canales de calcio en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular al citosol. Como consecuencia se produce un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la concentración acrosomal disminuye dando lugar a la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> de los almacenes, mecanismo denominado "SOC, store opens channels", lo que provoca un aumento sostenido de la concentración de Ca<sup>2+</sup> 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 proteín-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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\alpha$  ó ADAM1; fertilina  $\beta$  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.

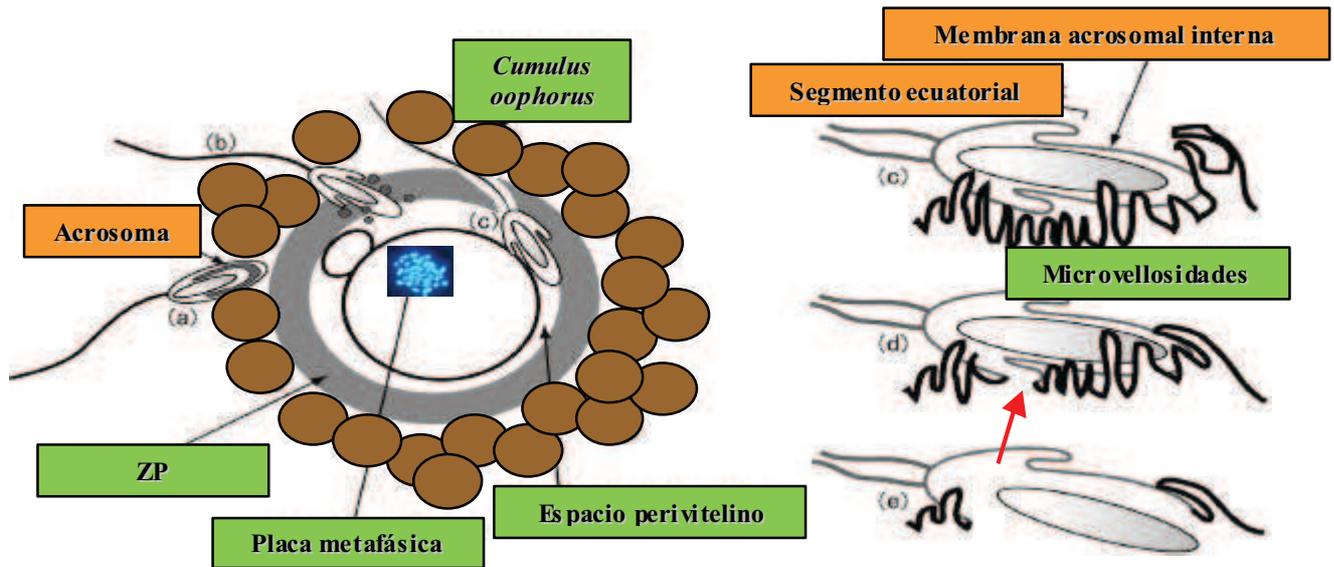
Los modelos animales han proporcionado hasta el momento la mayoría de la información existente sobre interacciones entre gametos, habiéndose comprobado posteriormente si dichas moléculas están involucradas en los procesos de fecundación en humanos.

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 (Nioque 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  $\alpha$  (ADAM 1) y fertilina  $\beta$  (ADAM 2).

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

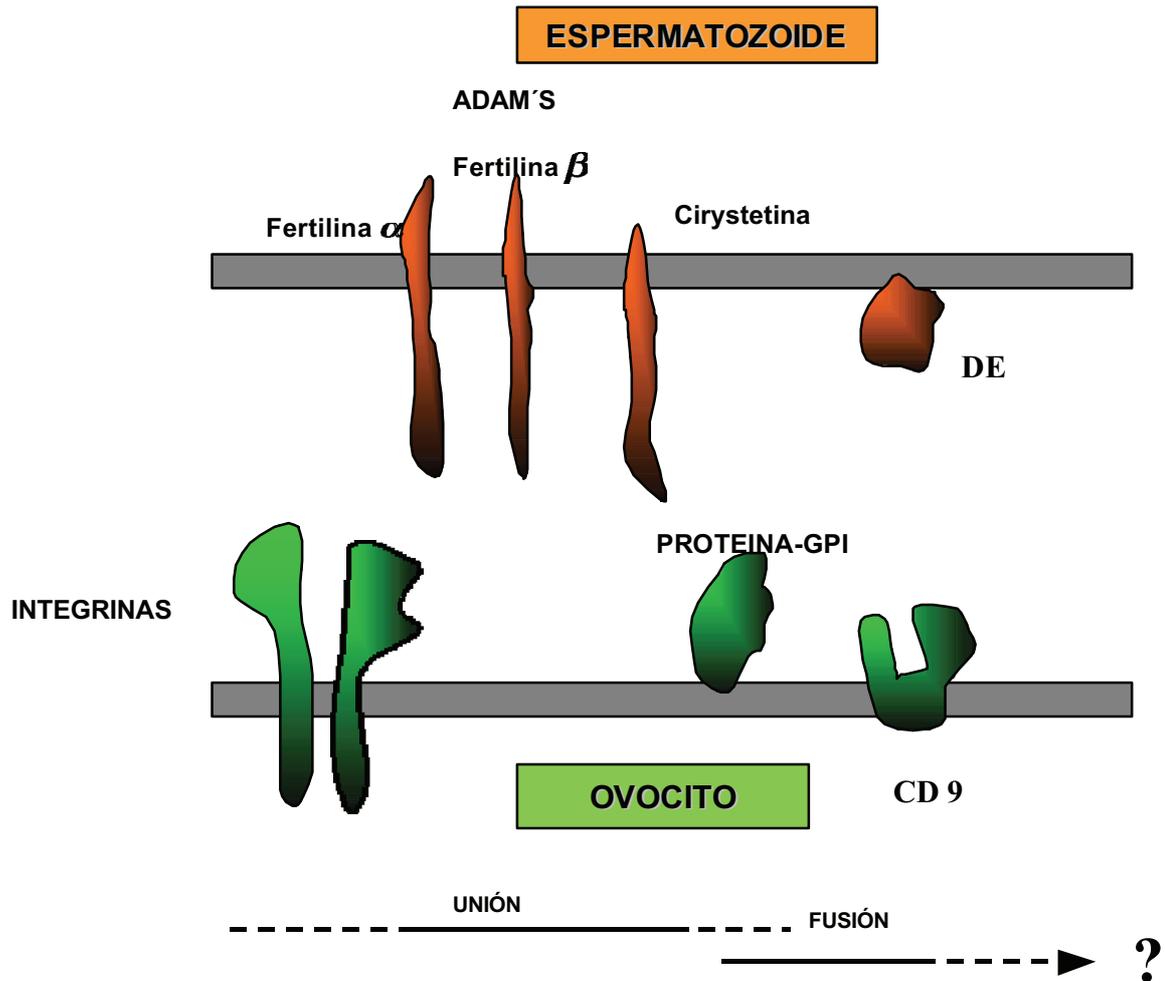
Mediante ensayos en los que se utilizaron secuencias de péptidos de la fertilina  $\beta$  de hámster (en concreto del dominio desintegrina), obtenidos mediante síntesis, se observó una importante reducción de la fusión entre espermatozoides y ovocitos (Myles y cols. 1994), por lo que se le ha atribuido 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  $\beta$ , 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  $\beta$  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  $\beta$  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 (Nioque 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,  $\alpha$ -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/il, 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 los 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 figurar 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).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describe la metodología seguida en el trabajo y los materiales utilizados. En referencia a los reactivos empleados, la mayoría fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich Química* (Madrid, España), por lo tanto sólo se hará mención expresa de la procedencia en caso contrario.

### 2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

La recogida del material biológico utilizado se realizó a partir de diferentes fuentes, según el tipo de material y la especie animal. Mención aparte merecen las muestras biológicas humanas, para cual se disponía del permiso de la Comisión Nacional de Reproducción Asistida.

#### 2.1.1. Obtención de espermatozoides

##### 2.1.1.1. Espermatozoides porcinos

Las muestras de espermatozoides porcinos proceden de verracos de fertilidad, del centro de inseminación artificial de la granja Lo Navarro de Murcia, S.A. El semen se obtuvo mediante el método manual, recogiendo la fracción rica del eyaculado. A continuación, en el laboratorio del centro de inseminación el semen se diluyó 1:1 en BTS (*Beltsville Thawing Solution*) y se trasladó, protegido de la luz, hasta el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Murcia.

##### 2.1.1.2. Espermatozoides bovinos

Los espermatozoides de toro utilizados procedían de dosis seminales congeladas de machos adultos de fertilidad comprobada, de la raza autóctona "Asturiana de los Valles" cedidas por la Asociación de Criadores (ASEAVA, Gijón). El semen se conservó en nitrógeno líquido (-196°C) en pajuelas de 0'5 ml en el laboratorio hasta su uso.

### 2.1.1.3. Espermatozoides humanos

Las muestras de espermatozoides humanos proceden de pacientes del centro IVI-Murcia con problemas de fertilidad (que llamaremos muestras “paciente”). Además se obtuvieron muestras de voluntarios de fertilidad probada (que llamaremos muestras “donante”). En ambos casos los hombres dieron previamente su consentimiento para el uso de dichas muestras. Además la Comisión Nacional de Reproducción Asistida, autorizó el uso de muestras de semen humano para los fines concretos de esta investigación, de acuerdo a la legislación vigente.

Las muestras se obtuvieron mediante masturbación, después de un período de abstinencia sexual de entre 3 a 5 días. Tras la recogida del eyaculado en recipiente estéril, se dejó en estufa a 37°C entre 30 y 60 minutos para permitir su licuefacción y a continuación se realizó la capacitación.

### 2.1.2. Obtención de ovocitos

#### 2.1.2.1. Ovocitos bovinos inmaduros

Los ovarios bovinos proceden de terneras con edades comprendidas entre 9 y 18 meses de edad, sacrificadas en el matadero Merca Murcia (El Palmar, Murcia) se transportaron en contenedor isoterma hasta el laboratorio durante la hora siguiente al sacrificio. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron en solución salina y los folículos mayores de 6 mm de diámetro se aspiraron y su contenido se descartó antes de comenzar a seccionar los demás folículos.

A continuación los folículos de entre 2 y 6 mm de diámetro se seccionaron con el uso de un bisturí, realizando incisiones paralelas en toda la superficie del ovario. El contenido se recogió en un vaso de precipitados que previamente contenía medio de recogida (OCM). Posteriormente se procedió al filtrado del

contenido mediante un sistema “Millipore” (**Figura 5**), que dispone de un filtro de “nylon” de 80µm diámetro de poro que permite el paso del fluido folicular y los restos celulares de menor tamaño, quedando retenidos los ovocitos cuyo diámetro aproximado es de 120µm. Se realizaron dos lavados añadiendo OCM limpio y a continuación se volcó el contenido en placas de Petri para seleccionar los ovocitos, utilizando un estereomicroscopio Nikon (modelo SMZ-10 A). Se seleccionaron aquellos ovocitos que estaban rodeados por varias capas compactas de células del *cumulus oophorus* y que mostraban un citoplasma homogéneo.



**Figura 5.** Sistema de filtrado para recogida de ovocitos bovinos.

#### 2.1.2.2. Ovocitos porcinos inmaduros

Los ovarios porcinos proceden de cerdas prepúberes sacrificadas en el matadero El Pozo (Alhama de Murcia) y se transportaron en contenedor isotermo tras el sacrificio hasta el laboratorio.

Los ovarios se lavaron en una solución de cetrimida (Bromuro de hexadecil-trimetilamonio) y posteriormente en solución salina atemperada. Los ovocitos se obtuvieron seccionando con hoja de bisturí, los folículos ováricos cuyo diámetro oscilaba entre 3 y 6 mm. El contenido se mezcló con PBS y se dejó sedimentar en tubos cónicos. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento se diluyó de nuevo con PBS limpio. Con ayuda del esteromicroscopio se seleccionaron los ovocitos que presentaban un citoplasma homogéneo y estaban rodeados de varias capas de células del *cumulus oophorus* con aspecto compacto y uniforme.

En ambas especies, porcino y bovino, los ovocitos seleccionados se aspiraron con una pipeta Pasteur adelgazada, de diámetro superior al de los complejos cúmulos-ovocito (COC's) y se colocaron en una placa con PBS. Posteriormente se realizaron dos lavados con el medio de maduración correspondiente en cada caso antes de transferirlos a la placa de maduración.

#### 2.1.2.3. Ovocitos ovulados (oviductales)

Con la finalidad de obtener ovocitos porcinos y bovinos ovulados se recogieron de matadero genitales de estas hembras en los que se observó que los ovarios presentaban puntos de ovulación recientes y se transportaron en un contenedor isoterma hasta el laboratorio. Allí, se aislaron los oviductos y se realizó un lavado de los mismos con PBS introduciéndolo con una jeringa a nivel de la unión útero-tubárica y recogéndolo por el otro extremo, en la zona del infundíbulo (**Figura 6**). El contenido se observó en el estereomicroscopio y se obtuvieron los ovocitos que había. Con este método se obtuvieron ovocitos ovulados *in vivo* y que habían estado en contacto con las secreciones del oviducto, desde su ovulación hasta la recogida.

**FIGURA 6. OBTENCIÓN OVOCITOS MADURADOS IN VIVO**

#### 2.1.2.4. Ovocitos madurados *in vivo* (foliculares)

Para obtener ovocitos madurados *in vivo*, sin necesidad de intervenir quirúrgicamente a los animales para este fin, se obtuvieron ovocitos de folículos preovulatorios, a partir de ovarios de porcino y bovino obtenidos de matadero. Se consideraron folículos preovulatorios aquellos que presentaban un diámetro aproximado de 15mm o superior en el caso de la vaca (Vasconcelos y cols. 1999) y próximo a los 10mm en el caso de la cerda (Conley y cols. 1994).

Los folículos seleccionados se aspiraron mediante una jeringa con aguja de calibre 18Ga. A continuación el contenido folicular se colocó en una placa y se observó en el estereomicroscopio y se localizaron los ovocitos.

#### 2.1.3. Obtención de fluido oviductal

Los oviductos se obtuvieron a partir de genitales de terneras entre 9 y 18 meses de edad sacrificadas en matadero. Los ovarios junto a los oviductos obtenidos en matadero, fueron transportados en seco en un contenedor isoterma hasta su llegada al laboratorio donde se colocaron en un baño de hielo.

Una vez en el laboratorio los oviductos se separaron del ovario y se diseccionaron eliminando el mesosálpinx que los rodeaba, utilizando tijeras y pinzas. Una vez diseccionados, se procedió a la recogida del fluido existente en la luz del oviducto, entre dos personas, utilizando una pipeta automática de 200  $\mu$ l (**Figura 7**).

A continuación el fluido obtenido se depositó en tubos pequeños y se centrifugó durante 10 minutos a 7000g. Se aspiró el sobrenadante y se congeló inmediatamente a  $-20^{\circ}$ C.

**FIGURA 7. OBTENCIÓN DE FLUIDO OVIDUCTAL**

## 2.2. MEDIOS DE TRANSPORTE, LAVADO y RECOGIDA DE LOS GAMETOS

### 2.2.1. Medio de transporte de los ovarios

El medio utilizado para el transporte de los ovarios, desde el matadero hasta los laboratorios de Fisiología Veterinaria de la Universidad de Murcia, en ambas especies, fue solución salina fisiológica (SSF) con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

### 2.2.2. Medio de lavado de los ovarios

En el caso de ovarios de vacas se utilizó solución salina fisiológica (SSF) para su lavado. Para los ovarios de cerda, se utilizó solución de cetrimida al 0'04% (w/v) y SSF. En ambos casos el lavado de los ovarios se realizó inmediatamente tras la llegada al laboratorio.

### 2.2.3. Medio de recogida de ovocitos de vaca (OCM)

El medio de recogida utilizado fue el TCM-199 modificado con sales de Hanks, L-Glutamina y rojo fenol, al que se le añadió bicarbonato sódico y Hepes, ajustando el pH a 7'4 (ver cuadro anexo). El día de su uso fue suplementado con suero fetal bovino (SFB), glutamina y antibióticos (Edwards y Hansen, 1996). El SFB fue suministrado por "Biological Industries" (Beitz Haemek, Israel).

MEDIO DE RECOGIDA DE OVOCITOS DE VACA (OCM)	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
M199 modificado con sales de Hanks, L-glutamina y rojo fenol (M-0393)	10'6 mg/L
☼ NaHCO <sub>3</sub>	4'2 mM
☼ Hepes	10 mM
☼ Suero fetal bovino	2 %
☼ Glutamina	2 mM
☼ Penicilina	10.000 UI/ml
☼ Estreptomicina	10.000 UI/ml

#### 2.2.4. Medio de recogida de ovocitos de cerda

El medio utilizado fue el Tampón Fosfato Salino de *Dubelcco* modificado (PBS) suplementado con 1 mg/ml de alcohol polivinílico (PVA) y 0'005 mg/l de rojo fenol como indicador de pH. Además, este medio fue utilizado para realizar lavados de los ovocitos y para su manejo.

#### 2.2.5. Medios de dilución de dosis seminales

El medio utilizado para la dilución de las dosis seminales de espermatozoides porcinos fue BTS (*Beltsville Thawing Solution*; Pursel y Johnson, 1975).

<b>Diluyente BTS</b> <b>(Beltsville Thawing Solution)</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
 Glucosa	0'0002 mM
 Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3'36 mM
 NaHCO <sub>3</sub>	15 mM
 Citrato-Na <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20 mM
 KCl	5 mM

### 2.3. MEDIOS DE CULTIVO (MADURACIÓN Y FIV)

Algunos de los medios de cultivo utilizados fueron elaborados en el laboratorio tal y como se indica a continuación. En estos casos se prepararon usando agua ultrapura (Milli-Q). A continuación, se esterilizaron por filtración mediante filtro de membrana con diámetro de 0'22 µm en cabina de flujo laminar y se conservaron en frigorífico a 4°C el tiempo indicado para cada caso.

#### 2.3.1. Medios de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos

El medio de MIV de ovocitos bovinos utilizado fue TCM-199 modificado con sales de Earle, L-Glutamina y rojo fenol, al que se le añadió bicarbonato y se ajustó el pH a 7'35. Cuatro horas antes de su utilización se le adicionó L-glutamina, piruvato de sodio, SFB, gentamicina, hCG (Chorulon, Intervet Internacional B.V., Boxmeer, Holanda) y PMSG (Foligon, Intervet Internacional B.V., Boxmeer, Holanda), y se equilibró en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 38'5°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Edwards y Hansen, 1996).

<b>MEDIO DE MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS BOVINOS (OMM)</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
☞ M199 con L-Glutamina y sales de Earle's	9'5 mg/L
☞ NaHCO <sub>3</sub>	26'2 mM
☞ L-Glutamina	2 mM
☞ Piruvato sódico	0'2 mM
☞ Suero Fetal Bovino	10 %
☞ Gentamicina	50 µg/ml
☞ FSH	10 UI/ml
☞ LH	10 UI/ml

Para la MIV de ovocitos porcinos se empleó el medio NCSU-37. Se preparó una solución "stock" que se conservó en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas. En el momento de su uso, se suplementó tal y como describieron Funahashi y cols. (1997) y como se refleja a continuación.

<b>MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS (NCSU-37)</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
☞ NaCl	108'73 mM
☞ NaHCO <sub>3</sub>	25'07 mM
☞ KCl	4'78 mM
☞ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1'19 mM
☞ MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1'19 mM
☞ CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1'70 mM
☞ Glucosa	5'55 mM
☞ D-Sorbitol	12'00 mM
☞ Penicilina G sódica	0'18 mM
☞ Estreptomina	39'00 UI/ml

SUPLEMENTO AL MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS DE CERDA (NCSU-37)	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
☼ Cisteína	0'57 mM
☼ â-mercaptoetanol	50'00 ì M
☼ Insulina	5'00 mg/l
☼ dbAMPc	1'00 mM
☼ Fluido folicular porcino	10% (v/v)
☼ PMSG	10 UI/ml
☼ hCG	10 UI/ml

El fluido folicular porcino (PFF) es un fluido biológico que *in vivo* ocupa el interior del folículo ovárico donde se aloja el ovocito. Este fluido se forma mayoritariamente como un trasudado de plasma a través de la lámina basal del folículo y se va acumulando en el antro folicular. Está compuesto por proteínas propias del plasma y además posee esteroides y glucoproteínas sintetizadas por las células de la pared folicular. Los folículos antrales grandes, contienen concentraciones altas de  $17\beta$ -estradiol en la fase folicular y de progesterona en los momentos próximos a la ovulación (Hafez, 2000).

El PFF utilizado se obtuvo mediante aspiración con jeringa de los folículos presentes en los ovarios obtenidos de matadero. Posteriormente, el fluido se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 3000g y se recogió el sobrenadante. A continuación se filtró a través de filtros de membrana de 0'2µm y se congeló hasta su uso a -20°C.

### 2.3.2. Medios de FIV

El medio de FIV bovina utilizado fue el FIV-TALP. Inicialmente se preparó el medio “FIV-stock” ajustado a un pH de 7.3, el cual se mantuvo en frigorífico a 4°C en condiciones estériles hasta 15 días. Previo a su uso, el “FIV-stock” se suplementó con BSA, piruvato de sodio, heparina y antibiótico como lo describen Parrish y cols. (1988), pasando a denominarlo “FIV-TALP”. Se equilibró durante 24 horas en cámara de cultivo con atmósfera humidificada a 38.5°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para la fecundación, 30 minutos antes, se añadieron 50 µl/ml de la mezcla epinefrina-hipotaurina-penicilamina (PHE). La solución final de PHE que se utilizó se preparó a partir de la mezcla de las soluciones intermedias (A, B, C y D), cuya composición de cada una de ellas se indica en la tabla correspondiente y PBS.

<b>MEDIO DE FECUNDACIÓN DE OVOCITOS DE VACA (FIV-STOCK)</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
NaCl	114 mM
KCl	3.2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.3 mM
Ácido láctico	10 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5 mM

<b>PHE</b>	
<b>SOLUCIÓN A (10 ml)</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
☞ Solución salina	10 ml
☞ Hipotaurina	1 mM
<b>SOLUCIÓN B (10 ml)</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
☞ Solución salina	10 ml
☞ Penicilamina	2 mM
<b>SOLUCIÓN C (50 ml)</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
☞ Ácido láctico	29'43 mM
☞ Meta bisulfito sódico	5'29 mM
☞ PBS	50 ml
<b>SOLUCIÓN D (40 ml)</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
☞ Solución C	40 ml
☞ Epinefrina	1'83 mg
<b>SOLUCIÓN FINAL (40 ml)</b>	
COMPONENTES	VOLUMEN
☞ Solución A	10 ml
☞ Solución B	10 ml
☞ Solución D	4 ml
☞ PBS	16 ml

Para la FIV en la especie porcina, se utilizó el medio TALP con las modificaciones descritas por Rath y cols. (1999). Se preparó una solución “stock” denominada “TALPp stock” la cual se conservó bajo condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

<b>MEDIO DE FECUNDACIÓN PORCINA (TALPp stock)</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
 NaCl	114'06 mM
 NaHCO <sub>3</sub>	25'07 mM
 KCl	3'20 mM
 NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0'35 mM
 MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'50 mM
 Lactato Ca•5H <sub>2</sub> O	8'00 mM
 Lactato sódico	10'00 mM
 Glucosa	5'00 mM
 Cafeína	2'00 mM
 Sulfato de kanamicina	0'17 mM
 Rojo fenol	0'003 mM
 PVA	1 mg/ml

Previamente a su uso como medio de fecundación, el medio “TALPp stock” se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos (BSA-FAF) y 0'12 mg/ml de piruvato sódico. El pH se ajustó hasta 7'4 en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, 38'5°C y atmósfera saturada de humedad durante 5h antes de su uso.

### 2.3.3. Medios de manipulación y capacitación de espermatozoides

El medio utilizado para la manipulación y capacitación de los espermatozoides bovinos fue SPERM-TALP (Edwards y Hansen, 1996) cuyo "stock" se preparó tal y como se indica a continuación en la tabla (SPERM-TALP STOCK). En el momento de usarlo, se le añadió BSA, piruvato de sodio, heparina y antibióticos, denominándose SPERM-TALP. Para la capacitación se utilizó un gradiente de Percoll® al 90% y 45% en SPERM-TALP.

<b>MEDIO DE MANIPULACIÓN Y CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS BOVINOS</b>	
<b>SPERM-TALP STOCK</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
NaCl	100 mM
KCl	3'2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0'3 mM
Ácido láctico	21'5 mM
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'4 mM
Hepes	10 mM

<b>MEDIO DE MANIPULACIÓN Y CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS BOVINOS</b>	
<b>SPERM-TALP</b>	
<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
Sperm-TALP-Stock	
BSA	6 mg/ml
Piruvato sódico	1 mM
Heparina	1'75 UI/ml
Penicilina	10.000 UI/ml
Estreptomicina	10.000 UI/ml

<b>PERCOLL®</b>	
<b>10X STOCK</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
NaCl	799'96 mM
KCl	30'85 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	28'98 mM
<b>PERCOLL® 90% (200 ml)</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
10 X Stock	20 ml
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Percoll	180'0 ml
MgCL <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0'395 mM
CaCl <sub>2</sub>	1'95 mM
<b>PERCOLL® 45% (10 ml)</b>	
COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
90% Percoll	5 ml
SPERM-TALP	5 ml

El medio de manipulación y capacitación de espermatozoides porcinos fue el TALP, suplementado del mismo modo que cuando se utilizó como medio de fecundación. Además se utilizó Percoll® (Amershan Biosciences, Upsala, Suecia) 90% y 45% preparado según la composición descrita en la tabla anterior, para la capacitación.

Para la manipulación y capacitación de espermatozoides humanos se utilizó “IVF Medicult” (Sydney, Australia) y “PureSperm Nidacom” (International AB, Suecia) cuya composición cualitativa declarada según el fabricante es la que se indica a continuación:

<b>MEDIO DE CULTIVO PARA GAMETOS HUMANOS (IVF Medicult®)</b>	
<b>Componentes declarados por el fabricante</b>	
	Solución balanceada de Sales de <i>Earle</i> (EBSS)
	Albúmina sérica humana (HSA)
	Glucosa
	Bicarbonato sódico
	Penicilina 50.000 UI/l
	Estreptomicina 50 mg/l
	Rojo Fenol

<b>MEDIO DE MANIPULACIÓN Y CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS</b>	
<b>PureSperm®</b>	
<b>Componentes declarados por el fabricante</b>	
	Sílice recubierta de silano
	Hepes
	Cloruros de sodio, potasio y calcio
	EDTA
	Glucosa
	Agua

## 2.4. PROCESADO DE LOS ESPERMATOZOIDES

### 2.4.1. Procesado de espermatozoides porcinos

Para su capacitación se utilizó gradiente de Percoll® 90% y 45% (v/v), sobre el que se depositó un volumen de 0'5 ml del semen diluido previamente en BTS. Se centrifugó a 700g durante 30 minutos. Las células espermáticas que atravesaron el gradiente y se depositaron en el fondo fueron aspiradas y se lavaron en medio TALP mediante centrifugación a 100g durante 10 minutos. Tras la centrifugación los espermatozoides se resuspendieron de nuevo en medio TALP. Se utilizó una alícuota de esta suspensión para comprobar la motilidad y determinar la concentración espermática mediante recuento en hemocitómetro, para ajustarla a una concentración final de  $10^5$  células/ml.

### 2.4.2. Procesado de espermatozoides bovinos

Los espermatozoides bovinos se procesaron de manera similar a la descrita para los espermatozoides porcinos. Treinta minutos antes de la FIV se procedió a la descongelación de la pajueta de semen (0'5 ml) en baño a 38'5°C durante 45 segundos y se depositó el semen de la pajueta en un gradiente de Percoll® 90% y 45% en SPERM-TALP, previamente atemperado (Parrish y cols., 1988). Seguidamente se centrifugó a 900g durante 10 minutos y se resuspendió el precipitado en 10 ml de medio "SPERM-TALP". Se centrifugó nuevamente a 300g durante 8 minutos y tras retirar el medio "SPERM-TALP", el precipitado obtenido se homogeneizó en 500 µl de medio FIV-TALP, previamente equilibrado. Se utilizó una alícuota de esta suspensión para comprobar la motilidad y determinar la concentración espermática mediante recuento en hemocitómetro. El resto de la suspensión se mantuvo en la cámara de cultivo mientras se calculó el volumen a utilizar de la suspensión espermática para alcanzar una concentración de  $10^6$  espermatozoides/ml que se utilizó para la FIV bovina.

### 2.4.3. Procesado de espermatozoides humanos

Un total de 60 muestras de semen humano fueron utilizadas. Tras la licuefacción de las muestras, se utilizó un gradiente de densidad para seleccionar los espermatozoides móviles. El medio utilizado fue PureSperm<sup>®</sup> Nidacom (International AB, Suecia) a 90% y 45%. Una vez depositado 1 ml del semen sobre el gradiente se sometió a centrifugación a 300g durante 15 minutos y se recuperó el sedimento, el cual se lavó con medio de cultivo (IVF Medicult<sup>®</sup> o TALP según la experiencia) a 600g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un volumen pequeño del medio utilizado. Una muestra alícuota de esta suspensión se utilizó para evaluar la motilidad y determinar la concentración espermática mediante recuento en hemocitómetro, mientras el resto de la suspensión se mantuvo en la cámara de cultivo mientras se calculó el volumen a utilizar de la suspensión espermática para alcanzar la concentración deseada en cada experiencia.

## 2.5. INDUCCIÓN Y VALORACIÓN DE LA RA

### 2.5.1. Inducción de RA con ionóforo de calcio

Para la inducción de la RA con ionóforo de calcio, se utilizó el ionóforo A23187 (*Fluka*, Madrid, España). Los espermatozoides humanos previamente capacitados mediante gradientes de "PureSperm" fueron incubados con 5 $\mu$ M de ionóforo de calcio durante 3 horas a 38'5°C en medio de fecundación (TALP o IVF Medicult<sup>®</sup>, según los grupos). Finalmente, los espermatozoides fueron centrifugados y lavados dos veces con medio limpio para eliminar los restos de ionóforo y una alícuota de esta muestra se utilizó para valorar el estado del acrosoma. El resto de la muestra fue utilizado en los experimentos que correspondían.

### 2.5.2. Inducción de RA con agonistas naturales.

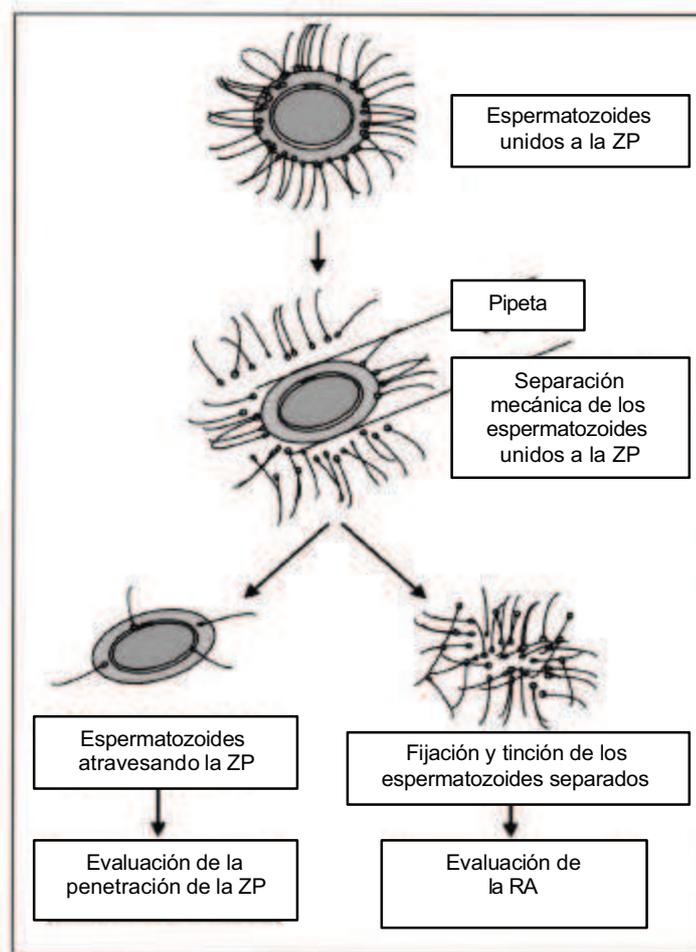
Como agonistas naturales de la inducción de la RA en espermatozoides humanos se utilizaron progesterona y fluido folicular porcino. Los agonistas se añadieron al medio de fecundación, de forma separada. Las concentraciones utilizadas fueron 10 $\mu$ M de progesterona, mientras que el fluido folicular se añadió a razón del 2% en el medio.

### 2.5.3. Valoración de la RA

Para la valoración del estado del acrosoma de los espermatozoides humanos unidos a la ZP, se siguió el método descrito por Liu y Baker (1996) utilizado para espermatozoides humanos, cuya representación esquemática aparece en la **Figura 8**.

Tras la incubación con los ovocitos, los espermatozoides con una adhesión lábil se eliminan aspirando los ovocitos varias veces con una pipeta de cristal de diámetro amplio; posteriormente los espermatozoides que permanecen unidos de forma son despegados de la superficie de la ZP utilizando una pipeta de diámetro ligeramente inferior al diámetro del ovocito (aproximadamente 120  $\mu$ m) en un pequeño volumen. Para su fijación se colocan sobre una pequeña área delimitada de un portaobjetos, dejando secar al aire y posteriormente se permeabiliza con metanol durante 30 minutos. Finalmente se realiza la tinción con la lectina PSA marcada con fluoresceína (FITC-PSA), a una concentración de 40 $\mu$ g/ml durante 20 minutos en estufa a 38'5°C. Las muestras se montaron utilizando *DABCO* y cubreobjetos, procediendo inmediatamente a su evaluación en el microscopio de fluorescencia. Se realizó el recuento de 200 espermatozoides para cada uno de los pocillos donde se habían incubado los espermatozoides. El resultado obtenido se expresó como porcentaje de RA.

Para evaluar el estado del acrosoma tras la tinción, se siguieron los criterios descritos por Cross y cols. (1988), Cummins y cols. (1991) y Franken y cols. (2000). Se consideraron como espermatozoides con el acrosoma reaccionado aquellos que presentaban algunos de los siguientes patrones: i) presencia de una zona teñida diferencial en la región ecuatorial a modo de banda; ii) ausencia de tinción sobre la superficie completa de la cabeza espermática y iii) tinción a modo de parcheado sobre la región acrosomal (**Figura 9**).



**Figura 8.** Representación esquemática de la técnica para determinar la inducción de la RA con ZP intacta. (Modificado de Liu y cols. 2004).

**FIGURA 9. VALORACIÓN RA**

## 2.6. MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

### 2.6.1. MIV de ovocitos bovinos

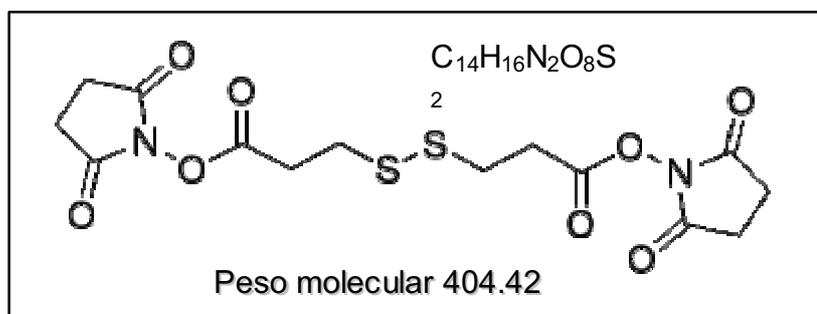
La MIV de los ovocitos seleccionados se efectuó en placas de intercambio gaseoso de cuatro pocillos (Nunclon™, Nunc, Dinamarca), en medio de maduración. La proporción de ovocitos/medio fue de 50/500µl. La maduración se realizó en atmósfera humidificada a 38'5°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En la vaca el tiempo de MIV de los ovocitos fue de 24 horas en OMM.

### 2.6.2. MIV de ovocitos porcinos

En la especie porcina, la MIV de los ovocitos se realizó en las mismas condiciones de incubación descritas para la especie bovina. El medio utilizado fue NCSU-37. Transcurridas las primeras 20-22 horas de maduración, los complejos *cumulus oophorus*-ovocito (CCO's) fueron transferidos a medio sin PMSG, hCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante otras 20-22 horas (Funahashi y Day, 1993).

### 2.6.3. Preincubación de ovocitos porcinos y bovinos en DTSP

El DTSP, o Di(N-succinimidil) 3,3'-ditiodipropionato Dithiobis(succinimidil propionato, (Fluka), fue diluido en DMSO a razón de 25 mg/ml y congelado a -20°C hasta su uso.



**Figura 10.** Estructura molecular del DTSP

Tras la maduración, y antes del momento de la fecundación, los ovocitos maduros se incubaron durante 30 minutos con DTSP a diferentes concentraciones según los grupos (0'06, 0'30 y 0'60 mg/ml) en medio de fecundación. Un grupo control con un volumen similar de DMSO se empleó como control en uno de los replicados. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados en medio de fecundación limpio y se procedió a su fecundación.

#### 2.6.4. Preincubación de ovocitos porcinos y bovinos en fluido oviductal

El fluido oviductal bovino congelado, obtenido previamente como se indicó en el apartado 2.1.3, se descongeló antes de su uso, manteniéndolo en el incubador para atemperarlo a 38'5°C, antes de incubar los ovocitos en el mismo. A continuación se colocó una gota de 50 µl de fluido en el interior de uno de los pocillos de una placa de cultivo "Nunclon"® y se cubrió con aceite mineral para evitar su evaporación. Se aspiró una pequeña cantidad de fluido en la pipeta a utilizar y los ovocitos, previamente lavados en PBS se introdujeron con la menor cantidad de medio en las gotas de fluido correspondientes. La proporción entre el volumen de fluido oviductal y el número de ovocitos incubados en el mismo fue de 1µl:1ovocito. La placa se mantuvo en el incubador a 38'5°C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad durante 30 minutos. Una vez finalizado el tiempo de incubación, los ovocitos fueron lavados en PBS y utilizados para diferentes experimentos (tiempo de digestión con pronasa o FIV).

### 2.7. DIGESTIÓN DE LA ZP CON PRONASA

En todos los grupos de ovocitos sometidos al proceso de digestión de la ZP con pronasa, de forma previa a la digestión, se eliminaron las células del *cumulus oophorus* con una pipeta automática, para facilitar la observación de la ZP.

### 2.7.1. Tiempo de digestión de la ZP

Los ovocitos desnudos se lavaron en PBS y se distribuyeron en grupos de 10, en microgotas de 50  $\mu$ l de solución de pronasa de *Streptomyces griseus* (4 U/mg) al 0'5 % en PBS. Una vez que se introdujeron en la microgota de pronasa comenzó a medirse el tiempo. Se consideró como tiempo final, el momento en que se observó la digestión completa de la ZP (**Figura 11**). Los ovocitos se observaron bajo el esteromicroscopio a 20 y 40 aumentos de forma continua durante los primeros 10 minutos de contacto con la pronasa. En los casos en que transcurridos los 10 minutos no se observó la digestión de la ZP, se controlaron de forma regular cada minuto. Transcurrida 1 hora sin observar la digestión de la ZP la frecuencia con que se controlaron fue aproximadamente cada 5 minutos y transcurridas 3 horas se controló el estado de la ZP cada 15 minutos aproximadamente. En los casos en que la ZP fue disolviéndose muy lentamente, para determinar el momento de la digestión completa de la ZP se observaron bajo microscopio invertido con óptica *Hoffman* a 200 aumentos.

### 2.7.2. Obtención de ovocitos libres de ZP

La metodología seguida para este proceso fue similar a la descrita en el apartado anterior en cuanto al enzima utilizado y distribución de los grupos. Se prestó especial atención a retirar rápidamente de la pronasa los ovocitos en el momento que se observó la digestión completa de dicha estructura. Seguidamente se procedió a realizar tres lavados de los ovocitos en PBS atemperado con abundante volumen, con la finalidad de eliminar los posibles restos de la pronasa. A continuación se mantuvieron en PBS atemperado durante 10 minutos, antes de ser inseminados.

**FIGURA 11. DIGESTIÓN ZP.**

## 2.8. FECUNDACIÓN IN VITRO

### 2.8.1. FIV homóloga (porcina y bovina)

En la especie porcina, se depositaron 50 ovocitos en 250 µl de medio TALP y se añadieron 250µl de espermatozoides procesados con Percoll® según se ha descrito anteriormente. El tiempo de cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides fue de 4 horas. Después de este tiempo, los ovocitos se lavaron muy bien mediante sucesivos pases a través de una pipeta Pasteur adelgazada para eliminar el exceso de espermatozoides adheridos a la ZP y se introdujeron en medio de fecundación TALP limpio hasta el día siguiente.

En la especie bovina, se retiró el medio de MIV del pocillo donde se encontraban los 50 ovocitos y rápidamente se añadieron 500µl del medio de FIV, donde además se añadieron 25µl de PHE y se incubó durante 30 minutos aproximadamente antes de proceder a la inseminación. En el momento de la inseminación, se añadió la cantidad de semen necesaria para alcanzar una concentración de  $10^6$  espermatozoides. El cocultivo se mantuvo durante 18-20 horas en incubador.

Una vez finalizado el periodo de cocultivo se procedió a la evaluación de la fecundación, mediante tinción y valoración en microscopio óptico de fluorescencia.

### 2.8.2. FIV homóloga y heteróloga con ovocitos libres de ZP

Para la FIV de ovocitos libres de ZP (en ambos casos) se utilizaron ovocitos porcinos de MIV, a los cuales se les eliminó la zona mediante digestión con pronasa, según lo descrito en el apartado 2.7.

Posteriormente, grupos de 50 ovocitos sin ZP fueron incubados en gotas de 40µl medio de FIV previamente equilibrado. Los espermatozoides porcinos o humanos fueron procesados según se describe en los apartados 2.4.1 y 2.4.3. Un volumen de 10µl del semen fue añadido a cada gota que contenía los ovocitos. Para los espermatozoides humanos, se utilizó inducción de la RA (ver apartado 2.5) en tres grupos utilizando ionóforo de  $Ca^{2+}$  o agonistas naturales (progesterona o fluido folicular), junto a un grupo de espermatozoides sin inducción de la RA.

A las 18-20 horas postinseminación, los ovocitos se lavaron en PBS y se sometieron a fijación y tinción según lo descrito en el apartado 2.8.5.

#### 2.8.3. FIV heteróloga con ovocitos completos

Para la coincubación de gametos heterólogos, se utilizaron ovocitos porcinos de MIV, según la metodología descrita anteriormente. Las muestras de espermatozoides humanos, previamente capacitados y resuspendidos en medio de fecundación (IVF Medicult<sup>®</sup> o TALP) según se ha descrito, se incubaron en presencia o ausencia de ovocitos porcinos. El número de ovocitos fue de 15 por microgota de 50µl. La coincubación se mantuvo durante 2'5 horas a 38'5°C en el incubador. Además, se incluyó un grupo en el que los espermatozoides humanos fueron coincubados con ovocitos porcinos madurados *in vitro*, a los que previamente se les había eliminado la ZP. Transcurrido el período de coincubación, se procedió a la valoración de la RA como se ha descrito en el apartado 2.5.3.

#### 2.8.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Los ovocitos utilizados para la ICSI, fueron ovocitos que tras 44 horas de maduración, se denudaron eliminando las células del *cumulus oophorus* mediante sucesivos pases de los COC's a través de una pipeta automática. Posteriormente,

se lavaron dos veces en PBS y se colocaron de forma individual en microgotas en las placas de microinyección.

Las placas utilizadas para realizar la ICSI fueron “*Falcon petri dish 50x9mm*” en las cuales se colocaron 3 gotas centrales de 4  $\mu$ l de la solución de PBS suplementado con 10% suero fetal bovino y se añadió 1  $\mu$ l de semen por gota, rodeadas por un número variable (10-14) de microgotas con un volumen de 4  $\mu$ l de PBS y un ovocito por gota. Las microgotas se cubrieron con aceite mineral para evitar su evaporación.

Para la microinyección se utilizó un microscopio invertido Nikon Diaphot 300 con óptica de Hoffman con los correspondientes micromanipuladores *TransferMan NK (Eppendorf)* y microinyectores *CellTram Air/CellTram Oil (Eppendorf)*. Dicho microscopio contaba con una placa térmica que mantiene la temperatura a 38.5°C. En primer lugar mediante una pipeta *Eppendorf Custom Tip sterile* (diámetro interno 8  $\mu$ m) se seleccionó e inmovilizó un espermatozoide. A continuación se realizó la inmovilización del ovocito mediante la pipeta de sujeción (*Eppendorf Sterile VacuTips*), colocando el ovocito maduro con el corpúsculo polar en posición de 6 ó 12 horarias, con el fin de evitar causar daño en la placa metafásica. A continuación, se presionó con la pipeta de microinyección en la posición de las 3 horarias para atravesar la ZP. Para comprobar si el extremo de la pipeta estaba en el interior se aspiró citoplasma para confirmar que se había atravesado el oolema, y se inyectó el espermatozoide en el interior del citoplasma, retirando la pipeta de forma cuidadosa para evitar arrastrar al espermatozoide fuera del ovocito.

Tras la microinyección, los ovocitos se lavaron en TALP y se dejaron en el incubador a 38.5°C con 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera saturada de humedad. La formación pronuclear se valoró a las 18-20 horas después de la microinyección.

### 2.8.5. Valoración de los resultados

Para evaluar los resultados de FIV, a las 18-20 horas post inseminación o post-ICSI los ovocitos se fijaron en glutaraldehído al 0'5% en PBS durante 30 minutos. A continuación los ovocitos se lavaron en PBS y se incubaron en oscuridad con una solución de Hoechst 33342 (1mg/ml) durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, los ovocitos se lavaron otra vez en PBS, y se adicionó sobre los mismos con la pipeta una pequeña cantidad de solución de montaje compuesta de Hoechst 1 mg/ml en PBS y glicerol en proporción 1:1 (v/v). A continuación, con una pipeta Pasteur se colocaron sobre un portaobjetos y sobre éste se colocó un cubreobjetos que se selló con esmalte. En el caso de los ovocitos sin ZP, este paso se realizó cuidadosamente para evitar la ruptura de la membrana plasmática del ovocito. Tras la tinción, los ovocitos fueron evaluados bajo microscopio de fluorescencia (*Leica DMR*) con filtro de fluorescencia para luz ultravioleta a 200-400 aumentos.

En la evaluación **(Figura 12)** se observó el estadio nuclear del ovocito (vesícula germinal, metafase, pronúcleo u otros) y la presencia/ausencia de espermatozoides y el estado en que se encontraban (espermatozoide compacto, descondensado, pronúcleo masculino, otros).

En el caso de la FIV heteróloga, se consideraron ovocitos no penetrados, aquellos que mostraron signos de no activación como la presencia de la placa metafásica, independientemente de la presencia de espermatozoides compactos en el ovocito.

Las variables estudiadas en el caso de la FIV homóloga (porcino y bovino) fueron: porcentaje de ovocitos penetrados, número de espermatozoides por ovocito y porcentaje de ovocitos penetrados monospermicos (los que tenían 2 pronúcleos o 1 pronúcleo y un espermatozoide descondensado). En el experimento de ICSI las variables analizadas fueron porcentaje de ovocitos activados y porcentaje de formación de pronúcleos masculino y femenino.

**FIGURA 12 EVALUACION FIV**

Parte a

**FIGURA 12 EVALUACION FIV**

Parte b

## 2.9. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.9.1. Bloque I: Modificaciones en la ZP que afectan a la interacción espermatozoide-ovocito homóloga

2.9.1.1. Endurecimiento de la ZP porcina y bovina con agentes químicos

2.9.1.1.1. Efecto del DTSP sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa y sobre los resultados de FIV en la especie porcina

### Experimento 1

Para comprobar el efecto del DTSP sobre el endurecimiento de la ZP porcina se utilizaron un total de 104 ovocitos porcinos. Un grupo de 50 ovocitos (grupo control) se mantuvo en el medio de FIV sin ningún tratamiento, mientras que el resto se incubó con DTSP según se ha descrito en la metodología. Se realizaron 4 replicados con 12-14 ovocitos por grupo y replicado. Se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida.

### Experimento 2

Para evaluar el efecto del DTSP sobre los resultados de fecundación se emplearon grupos de 100 ovocitos, 50 de los cuales se utilizaron como control y los restantes fueron tratados con DTSP (0'60 mg/ml) antes de la fecundación. Se realizaron 3 replicados y se evaluó el porcentaje de penetración, el porcentaje de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

### Experimento 3

Con el fin de averiguar si el efecto del DTSP sobre los resultados de FIV era dosis dependiente, se utilizaron 3 concentraciones distintas del producto (0'06, 0'30 y 0'60 mg/ml) para el tratamiento de los ovocitos previo a la FIV, junto a un grupo control (sin el producto). Se emplearon aproximadamente 80 ovocitos por grupo, distribuidos en 4 replicados, con un total de 338 ovocitos utilizados. Tras la FIV se evaluó el porcentaje de penetración, el porcentaje de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

2.9.1.1.2. Efecto del DTSP sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa y sobre los resultados de FIV en la especie bovina

### Experimento 4

Con el objetivo de comprobar el efecto del DTSP sobre el endurecimiento de la ZP bovina se utilizaron un total de 144 ovocitos bovinos, distribuidos en dos grupos. Aproximadamente la mitad de los ovocitos (n=70, grupo control) se mantuvo en el medio de FIV sin ningún tratamiento, mientras que el resto (n=74) se incubó con DTSP según se ha descrito en la metodología. Se realizaron 4 replicados con un total de 15-20 ovocitos por grupo y se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida.

### Experimento 5

Para evaluar el efecto del DTSP sobre los resultados de fecundación se emplearon un total de 138 ovocitos, repartidos en dos grupos. Aproximadamente la mitad se utilizaron como control y los restantes fueron tratados con DTSP (0'60 mg/ml) antes de la fecundación. Se realizaron 3 replicados y se evaluó el

porcentaje de penetración, el porcentaje de monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado.

#### 2.9.1.2. Endurecimiento de la ZP porcina y bovina con agentes biológicos

##### 2.9.1.2.1. Efecto del fluido oviductal sobre la resistencia a la digestión con pronasa y sobre los resultados de FIV en la especie porcina

### Experimento 6

En este experimento se utilizaron un total de 139 ovocitos porcinos para comprobar el efecto del fluido oviductal sobre el endurecimiento de la ZP porcina. Para ello, se incubaron en grupos de 12-14 un total de 54 ovocitos madurados *in vitro* en fluido oviductal bovino, mientras que el grupo control (52 ovocitos) se mantuvo en TALP. Se realizaron 3 replicados y a continuación se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida utilizando pronasa al 0'5%.

Además, se obtuvieron ovocitos ovulados, tal y como se describe en el apartado 2.1.2.3 y se registró el tiempo necesario para digerir la ZP utilizando pronasa. También se obtuvieron ovocitos madurados *in vivo* de origen folicular, mediante aspiración de folículos preovulatorios.

### Experimento 7

En este experimento se estudió si el efecto del fluido oviductal se mantenía constante a lo largo del tiempo, después de finalizada la incubación de los ovocitos en dicho fluido. Para ello se utilizaron ovocitos porcinos madurados *in vitro* distribuidos en 11 grupos. Inicialmente los ovocitos se dividieron según se incubaran o no en fluido oviductal. Los ovocitos no incubados correspondían al grupo control, con un total de 83 ovocitos, que se incubaron en medio TALP y se

evaluaron para registrar el tiempo de digestión con pronasa. El resto se incubaron en fluido oviductal durante 30 minutos. Tras la incubación, un grupo de ovocitos se utilizó para medir el tiempo de digestión en pronasa, mientras que el resto se incubó en medio TALP. A diferentes intervalos de tiempo de incubación en medio TALP (15, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 240 y 300 minutos), se fueron tomando grupos de ovocitos y midiendo el tiempo de digestión con pronasa.

### Experimento 8

Para evaluar el efecto del fluido oviductal sobre los resultados de fecundación porcina se utilizaron 304 ovocitos, repartidos en dos grupos. Aproximadamente la mitad se utilizaron como control y los restantes fueron incubados en fluido oviductal antes de la fecundación. Se realizó la fecundación en 4 replicados y se evaluaron los siguientes parámetros: porcentaje de penetración, porcentaje de monospermia y número medio de espermatozoides por ovocito penetrado, para cada uno de los grupos.

#### 2.9.1.2.2. Efecto del fluido oviductal sobre la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa en la especie bovina

### Experimento 9

Un total de 121 ovocitos fueron utilizados en este experimento con el fin de comprobar el efecto del fluido oviductal sobre el endurecimiento de la ZP bovina. Para ello, se incubaron un total de 25 ovocitos madurados *in vitro* en fluido oviductal bovino, mientras que otro grupo (control) se mantuvieron en TALP. Se realizaron 3 replicados y a continuación se registró para cada ovocito el tiempo que tardó la ZP en ser digerida utilizando pronasa al 0'5%. Además, se obtuvieron ovocitos ovulados, tal y como se describe en el apartado 2.1.2.3 y se registró el tiempo necesario para digerir la ZP utilizando pronasa. También se obtuvieron ovocitos madurados *in vivo* (foliculares), mediante aspiración de folículos preovulatorios.

## Experimento 10

En este experimento se estudió si el efecto del fluido oviductal se mantenía a lo largo del tiempo después de finalizada la incubación en dicho fluido. Para ello se utilizaron 458 ovocitos bovinos madurados *in vitro* distribuidos en 11 grupos. Del total, 36 ovocitos (grupo control) se incubaron en TALP, mientras el resto se incubó en fluido oviductal. Transcurridos los 30 minutos de incubación se registró el tiempo de digestión con pronasa para el grupo control y uno de los grupos incubados en fluido oviductal. Los restantes ovocitos se pasaron a medio TALP y a diferentes intervalos de tiempo (15, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 240 y 300 minutos) se sacaron parte de ellos y se registró el tiempo necesario para la digestión de la ZP con pronasa.

2.9.2. Bloque II: Interacción espermatozoide-ovocito heteróloga: Diseño de un modelo para el desarrollo de un test de funcionalidad espermática

2.9.2.1. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la ZP

## Experimento 11

En este experimento se estudia la capacidad de los espermatozoides humanos de sufrir la RA tras la unión a la ZP porcina en dos medios de cultivo diferentes (TALP y *Medi-Cult* ®*Universal IVF*). Se utilizaron 3 muestras de semen humano que fueron incubadas utilizando los dos medios de cultivo para cada muestra. Todas las muestras se incubaron en presencia (grupos experimentales) de ovocitos porcinos madurados *in vitro* (15 ovocitos/ 50µl) y una parte alícuota de cada muestra se incubó sin ovocitos (grupos control). La RA fue evaluada en cada

uno de los grupos y el porcentaje de RA inducida en los grupos experimentales se calculó según la diferencia respecto a la RA espontánea observada en los grupos control.

## Experimento 12

Utilizando el medio de incubación *Medi-Cult* ®*Universal IVF*, que es un medio de cultivo de uso habitual en clínicas de reproducción humana, se emplearon 12 muestras de semen humano para estudiar la capacidad de los espermatozoides de sufrir la RA tras la unión a la ZP porcina y observar si existían diferencias según las muestras seminales utilizadas. Además, se incluyó un grupo en el que las muestras de semen fueron coincubadas bajo las mismas condiciones, pero con ovocitos sin ZP. La incubación se realizó a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  espermatozoides/ml durante 2.5 horas. Se evaluó el estatus acrosomal de los espermatozoides adheridos al ovocito (ZP u oolema).

### 2.9.2.2. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel de la membrana plasmática

## Experimento 13

En este experimento se estudió la capacidad de los espermatozoides humanos para fusionarse con ovocitos porcinos madurados *in vitro* libres de ZP. Los ovocitos porcinos (aproximadamente 1800) sin ZP se coincubaron con 33 muestras de espermatozoides humanos; en 15 de ellas una parte de la muestra fue tratada con ionóforo de calcio ( $5\mu\text{M}$ ), progesterona ( $10\mu\text{M}$ ) o fluido folicular (2%) para inducir la RA y el resto se utilizó sin inducción de RA. Se utilizaron diferentes grupos control: i) ovocitos porcinos inseminados con espermatozoides porcinos, ii) ovocitos porcinos libres de ZP inseminados con espermatozoides porcinos y

iii) ovocitos porcinos inseminados con espermatozoides humanos. Antes de la incubación, una cantidad alícuota de muestra de semen fue teñida con PSA-FITC y se evaluó el estatus acrosomal de los espermatozoides. Finalmente, tras la coincubación durante 18-20 horas, los ovocitos se fijaron y tiñeron con Hoechst 3342 para evaluar adhesión, penetración y presencia de espermatozoides descondensados en el ooplasma y estadio nuclear del ovocito. En la **figura 13** puede verse la representación esquemática de este experimento.

#### 2.9.2.3. Estudio de la interacción espermatozoide humano-ovocito porcino a nivel del citoplasma

### Experimento 14

El objetivo de este experimento consistió en investigar la capacidad de los espermatozoides humanos, procedentes de muestras de pacientes o donantes de fertilidad probada, microinyectados en un ovocito porcino madurado *in vitro* para descondensarse, transformarse en pronúcleo masculino y activar al ovocito tras la microinyección. Se emplearon 12 muestras de semen humano con las que se inyectaron aproximadamente 10 ovocitos porcinos por muestra. Tras la microinyección, los ovocitos se incubaron en medio TALP durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, se fijaron y tiñeron como se ha descrito en la metodología para evaluar el estado de la cabeza espermática y el estadio nuclear del ovocito.

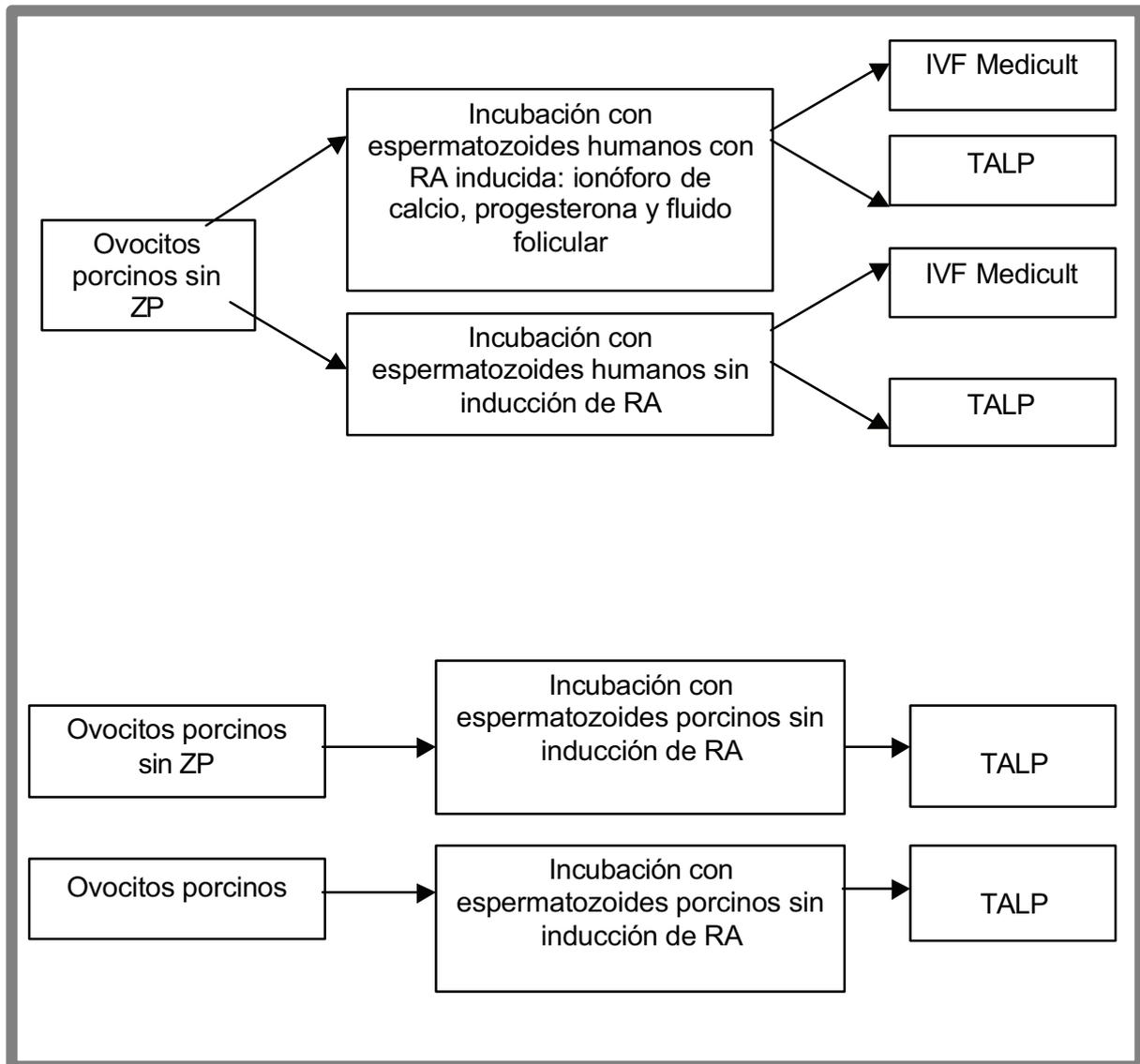


Figura 13. Representación esquemática del experimento 13.

## 2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa utilizado para el análisis estadístico fue SPSS versión 11.5 para Windows.

Los resultados de las variables estudiadas (tiempo de digestión en pronasa, porcentaje penetración y de monospermia, número de espermatozoides por ovocito y porcentaje de RA), se expresan como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando este análisis reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el Test de *Tukey*, considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad  $p < 0.05$ .

En las experiencias del 1 al 10, el efecto fijo fue el tratamiento a que se sometieron los ovocitos (control, DTSP, FO) o el origen de dichos ovocitos (inmaduros, MIV, oviductales, foliculares) y se estudiaron las variables: tiempo de digestión en pronasa, porcentaje de penetración y de monospermia, número de espermatozoides por ovocito.

Los resultados de la experiencia 13 no se sometieron a análisis estadístico porque son suficientemente descriptivos, teniendo en cuenta que la penetración fue del 0% en todos los grupos experimentales, mientras que en los dos grupos de control de FIV la penetración fue mayor del 85%, lo cual es indicativo de que el sistema de FIV funciona, mientras que en los grupos experimentales no hay fecundación.

Respecto al experimento 14 tampoco fue necesario hacer análisis estadístico de los datos, ya que los resultados aportaron información suficiente para demostrar que la ICSI heteróloga funciona y hay formación de PN masculino y femenino con todas las muestras (“donante” y “paciente”). A su vez se observa que sólo en las muestras procedentes de donantes de fertilidad probada hubo división, sin que se observe este hecho en ninguna de las muestras “paciente”.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. EFECTO DEL DTSP SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZP A LA DIGESTIÓN CON PRONASA Y SOBRE LOS RESULTADOS DE FIV EN LA ESPECIE PORCINA

##### 3.1.1. Experimento 1

Utilizando el DTSP a una concentración de 0'60 mg/ml, los resultados obtenidos demuestran que esta sustancia provoca un aumento significativo en el tiempo de digestión con pronasa (TDP) de ovocitos porcinos madurados *in vitro* en comparación con el grupo control (tabla 3.1). Este aumento supuso un incremento de 57 veces respecto al grupo control, del tiempo medio necesario para la digestión completa de la ZP.

**Tabla 3.1.** Efecto del DTSP (0'60 mg/ml) sobre la resistencia a la digestión con pronasa de la ZP porcina.

Tratamiento ovocitos porcinos	N	Tiempo digestión pronasa (s)
CONTROL	50	65'4 ± 4'9 <sup>a</sup>
DTSP (0'60 mg/ml)	54	3.743'6 ± 169'4 <sup>b</sup> (x 57)

<sup>a, b</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.01).

## 3.1.2. Experimento 2

El DTSP a la concentración de 0'60 mg/ml afectó a los tres parámetros evaluados tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina, (porcentaje de penetración, porcentaje de monospermia y número medio de espermatozoides por ovocito, tabla 3.2). En relación al porcentaje de penetración, el DTSP provocó una disminución significativa del mismo, superior al 25%. En cuanto al porcentaje de monospermia se observó un aumento significativo del número de ovocitos fecundados que fueron penetrados por un solo espermatozoide, que pasó del 7'5% al 37%. Paralelamente, el número medio de espermatozoides por ovocito, muy elevado en el grupo control (12'7) experimentó una drástica disminución en los ovocitos preincubados con DTSP.

**Tabla 3.2.** Efecto de la preincubación de ovocitos en DTSP (0'60 mg/ml) sobre diferentes parámetros relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

Tratamiento ovocitos porcinos	N	Penetración (%)	Monospermia (%) <sup>1</sup>	E/O
CONTROL	149	97'9 ± 1'2 <sup>a</sup>	7'5 ± 2'2 <sup>a</sup>	12'7 ± 0'5 <sup>a</sup>
DTSP (0'60 mg/ml)	149	71'1 ± 3'7 <sup>b</sup>	36'8 ± 4'7 <sup>b</sup>	2'8 ± 0'2 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> : Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.01).

<sup>1</sup> Monospermia (%): porcentaje de ovocitos monospermicos del total de ovocitos penetrados.

**E/O**: número medio de espermatozoides por ovocito

### 3.1.3. Experimento 3

Al igual que en el experimento anterior, cuando el DTSP se empleó a una concentración de 0'60 mg/ml, se observó una disminución en el porcentaje de penetración, y un aumento en el porcentaje de monospermia, a pesar de las diferencias de los resultados, debido a que el experimento 2 y 3 se realizaron en distintos momentos y con diferentes controles.

Cuando la concentración de DTSP empleada fue menor (0'06 mg/ml ó 0'30 mg/ml), la penetración no disminuyó, mientras que si observó un efecto sobre el porcentaje de monospermia, que fue muy superior en los grupos tratados. Con la concentración de 0'06 mg/ml, este porcentaje supuso un aumento del 20% aproximadamente; sin embargo, cuando se empleó la concentración de 0'30 mg/ml de DTSP, la monospermia alcanzó valores próximos al 50%, manteniendo un elevado porcentaje de penetración, lo cual hizo que el rendimiento final del proceso alcanzara valores cercanos al 48%. Además, se observó una disminución progresiva del número de espermatozoides por ovocito al aumentar la concentración de DTSP.

En resumen, se observa que el uso del DTSP a cualquiera de las concentraciones utilizadas provocaba un aumento significativo del porcentaje de monospermia y del rendimiento total de la FIV. Este rendimiento es máximo a la concentración de 0'30 mg/ml de DTSP.

Los efectos observados sobre los parámetros evaluados tras la FIV utilizando ovocitos tratados con DTSP, demuestran un efecto significativo sobre la penetración cuando se utiliza una concentración de 0'60 mg/ml de DTSP, mientras las concentraciones de 0'30 y 0'06 mg/ml no afectan a este parámetro. Por el contrario, la monospermia y el número medio de espermatozoides por ovocito se ve afectada por cualquier de las concentraciones utilizadas, observándose una mejora del

rendimiento final de la FIV, cuyos valores son de 5'0 % para el control frente al 23'8, 47'6 y 37'8 % para las concentraciones ascendentes (0'06, 0'30 y 0'60 mg/ml) de DTSP utilizadas.

**Tabla 3.3.** Efecto de la preincubación de ovocitos con DTSP a diferentes concentraciones sobre los resultados de fecundación *in vitro* en la especie porcina.

Tratamiento ovocitos porcinos	N	Penetración (%)	Monospermia (%)	E/O
CONTROL	83	97'6 ± 1'7 <sup>a</sup>	5'2 ± 2'5 <sup>a</sup>	5'2 ± 0'3 <sup>a</sup>
DTSP (0'06 mg/ml)	94	91'5 ± 2'9 <sup>a</sup>	26'0 ± 5'1 <sup>b</sup>	2'9 ± 0'9 <sup>b</sup>
DTSP (0'30 mg/ml)	83	94'0 ± 2'6 <sup>a</sup>	50'7 ± 5'8 <sup>c</sup>	1'9 ± 0'1 <sup>c</sup>
DTSP (0'60 mg/ml)	78	60'3 ± 5'6 <sup>b</sup>	62'2 ± 7'3 <sup>c</sup>	1'6 ± 0'2 <sup>c</sup>

**a, b, c**: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ).

**E/O**: Número medio de espermatozoides por ovocito

### 3.2. EFECTO DEL DTSP SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZP A LA DIGESTIÓN CON PRONASA Y SOBRE LOS RESULTADOS DE FIV EN LA ESPECIE BOVINA

#### 3.2.1. Experimento 4

Los ovocitos de vaca madurados *in vitro* e incubados en DTSP durante 30 minutos fueron más resistentes a la digestión con pronasa que los ovocitos no tratados (Tabla 3.4). El tiempo medio para los ovocitos tratados fue aproximadamente 14 veces mayor que para el grupo control.

**Tabla 3.4.** Efecto del DTSP (0'60 mg/ml) sobre la resistencia a la digestión con pronasa de la ZP bovina.

Tratamiento ovocitos bovinos	N	Tiempo digestión pronasa (s)
CONTROL	70	124'2 ± 5'9 <sup>a</sup>
DTSP (0'60 mg/ml)	74	1.777'9 ± 64'0 <sup>b</sup> (x 14)

<sup>a, b</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.01).

#### 3.2.2. Experimento 5

El tratamiento de los ovocitos bovinos con DTSP antes de la FIV provoca una drástica disminución de la penetración, de modo que existen diferencias significativas entre los grupos Control y DTSP para esta variable. A la misma vez, el porcentaje de ovocitos monospermicos, también se ve afectado por el tratamiento, observándose

un incremento significativo de la monospermia en el grupo tratado respecto al control. Una vez calculado el rendimiento final de la técnica, teniendo en cuenta las dos variables antes indicadas (penetración y monospermia), se observa que el rendimiento es mayor en el grupo control (50%) que en el grupo tratado con DTSP (36'9%).

**Tabla 3.5.** Efecto de la preincubación de ovocitos en DTSP (0'60 mg/ml) sobre diferentes parámetros relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

Tratamiento ovocitos bovinos	N	Penetración (%)	Monospermia (%)	E/O
CONTROL	74	91'9 ± 3'2 <sup>a</sup>	54'4 ± 6'1 <sup>a</sup>	1'68 ± 0'1
DTSP (0'60 mg/ml)	64	57'8 ± 6'2 <sup>b</sup>	63'9 ± 8'1 <sup>b</sup>	1'58 ± 0'1

<sup>a, b</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.01).

**E/O**: Número medio de espermatozoides por ovocito

### 3.3. EFECTO DEL FO SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZP A LA DIGESTIÓN CON PRONASA Y SOBRE LOS RESULTADOS DE FIV EN LA ESPECIE PORCINA

#### 3.3.1. Experimento 6

La ZP de los ovocitos ovulados, fue resistente a la digestión con pronasa durante un tiempo aproximado de 3 horas y 45 minutos, mientras que el tiempo para los ovocitos de MIV fue muy inferior, entorno a 1 minuto (Tabla 3.6). En el caso de los ovocitos porcinos madurados *in vivo* (foliculares), el TDP fue ligeramente superior

al de folículos preovulatorios, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por último, para el grupo de ovocitos de MIV que se incubaron durante 30 minutos en FO (Ovocitos MIV + 30 min FO), se obtuvo un TDP muy elevado, con una media superior a 3'5 horas, similar a los tiempos obtenidos para los ovocitos ovulados. A pesar de que el número de ovocitos ovulados utilizados fue reducido debido a la dificultad de su obtención, teniendo en cuenta la gran variación de los valores, el análisis estadístico indicó que las diferencias eran significativas para un valor de  $P < 0.01$ . Los tiempos de digestión obtenidos para el grupo "Ovocitos MIV + 30 min FO" fueron aproximadamente 200 veces mayores que los del grupo "Ovocitos MIV" y entorno a 130 veces superiores al grupo "Ovocitos madurados *in vivo* (foliculares)".

**Tabla 3.6.** Valoración de la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa en ovocitos porcinos.

Origen de los ovocitos	N	Tiempo digestión pronasa (s) (TDP)
Ovocitos MIV	54	63'5 ± 2'9 <sup>a</sup>
Ovocitos ovulados	11	13.691'9 ± 1228'1 <sup>b</sup>
Ovocitos madurados <i>in vivo</i> (foliculares)	22	96'8 ± 4'2 <sup>a</sup>
Ovocitos MIV + 30 min FO	52	12.657'1 ± 829'0 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ).

### 3.3.2. Experimento 7.

Los ovocitos preincubados en FO, e incubados a continuación en medio de FIV, muestran un TDP que van disminuyendo a lo largo del tiempo. Esta disminución es drástica en los primeros 15 minutos, y continúa disminuyendo, hasta las 5 horas. En ese momento los ovocitos todavía muestran un TDP muy superior a los ovocitos no tratados con FO, pero inferior a los ovocitos tratados con FO y sometidos a digestión con pronasa seguidamente. El TDP para ovocitos no tratados obtenido en este experimento fue similar al observado en otros ( $63'7 \pm 2'3$  s; n=83).

**Tabla 3.7.** Reversibilidad del efecto del FO sobre el endurecimiento de la ZP porcina.

Tratamiento ovocitos porcinos	N	Tiempo digestión pronasa (s) (TDP)
30 min FO	101	$10.587'1 \pm 577'1$ <sup>a</sup>
30 min FO + 15 min TALP	50	$2737'0 \pm 239'8$ <sup>b</sup>
30 min FO + 40 min TALP	49	$2.250'6 \pm 198'7$ <sup>b, c</sup>
30 min FO + 60 min TALP	50	$2.017'0 \pm 186'8$ <sup>b, c</sup>
30 min FO + 80 min TALP	47	$1.995'7 \pm 187'7$ <sup>b, c</sup>
30 min FO + 100 min TALP	49	$1.502'6 \pm 69'3$ <sup>b, c</sup>
30 min FO + 120 min TALP	57	$1.295'4 \pm 77'4$ <sup>b, c</sup>
30 min FO + 160 min TALP	59	$991'2 \pm 53'5$ <sup>b, c</sup>
30 min FO + 240 min TALP	64	$815'9 \pm 100'4$ <sup>c</sup>
30 min FO + 300 min TALP	29	$675'1 \pm 46'8$ <sup>c</sup>

<sup>a, b, c, d</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ). **FO**: Fluido oviductal.

### 3.3.3. Experimento 8

En este experimento, el porcentaje de penetración de los ovocitos porcinos no mostró diferencias entre el grupo control y el grupo experimental (30 min FO), en el cual los ovocitos habían sido, previamente a la FIV, incubados con FO.

Sin embargo, la variable monospermia se vio afectada por el tratamiento, mostrando diferencias significativas entre ambos grupos. A su vez, también el número de espermatozoides por ovocito (E/O) mostró diferencias significativas entre los dos grupos, comprobándose una relación inversamente proporcional entre la monospermia y la variable E/O. En cuanto al rendimiento final de la FIV para el grupo control se obtuvo un 7'7% frente al 25'3 % del grupo tratado con FO, lo que supone un incremento considerable, debido al efecto del tratamiento de los ovocitos con FO.

**Tabla 3.8.** Efecto del FO sobre diferentes parámetros relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

Tratamiento ovocitos porcinos	N	Penetración (%)	Monospermia (%)	E/O
CONTROL	147	95'5 ± 2'2 <sup>a</sup>	8'1 ± 2'3 <sup>a</sup>	8'2 ± 0'4 <sup>a</sup>
30 min FO	157	87'3 ± 2'7 <sup>a</sup>	29'0 ± 3'9 <sup>b</sup>	2'7 ± 0'2 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.001).

### 3.4. EFECTO DEL FO SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZP A LA DIGESTIÓN CON PRONASA EN LA ESPECIE BOVINA

#### 3.4.1. Experimento 9

La ZP de los ovocitos bovinos ovulados obtenidos tras el lavado de los oviductos fue altamente resistente a la digestión con pronasa (más de 31.000 segundos, 250 veces superior al control (Tabla 3.9), al igual que se observó anteriormente para la especie porcina (Tabla 3.6). Cuando los ovocitos bovinos se obtuvieron de folículos preovulatorios, este tiempo disminuyó hasta valores medios de 235 segundos. Por el contrario, la incubación en FO, de los ovocitos bovinos madurados *in vitro*, provocó un incremento en el TDP de más de 34 veces respecto al tiempo observado en el grupo control.

**Tabla 3.9.** Valoración de la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa en ovocitos bovinos madurados *in vivo* o *in vitro* bajo diferentes condiciones.

Origen de los ovocitos	N	Tiempo digestión pronasa (s) (TDP)
Ovocitos MIV	70	124'2 ± 5'9 <sup>a</sup>
Ovocitos ovulados	7	31.448 ± 4.856 <sup>c</sup>
Ovocitos madurados <i>in vivo</i> (foliculares)	19	234'7 ± 11'4 <sup>a</sup>
Ovocitos MIV + 30 min FO	25	4.301'1 ± 441'7 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup>: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.01). **FO**: Fluido oviductal.

#### 3.4.2. Experimento 10

En la tabla 3.10 se muestran los datos obtenidos sobre la reversibilidad del efecto del FO sobre la ZP bovina.

Los resultados reflejan que el efecto de endurecimiento sobre la ZP consecuencia de la incubación en FO, disminuye cuando los ovocitos tras el FO se incuban en medio de FIV, de forma parecida a lo que ocurre en porcino.

Tras 15 minutos en medio de FIV, los ovocitos que habían sido previamente incubados en FO, presentan un TDP entorno a 47 minutos, lo que supone una disminución frente a los 72 minutos de los ovocitos cuya digestión se realizó inmediatamente tras la incubación en FO, sin incubar en medio TALP.

Los tiempos de digestión con pronasa fueron inversamente proporcionales al tiempo que habían permanecido en el medio de FIV los ovocitos, después del tratamiento con FO. Transcurridas 5 horas en el medio de FIV, el TDP de los ovocitos era próximo a los 17 minutos, frente a los 2 minutos aproximadamente ( $102'5 \pm 4'2$  s; n=36) que se obtuvo en ovocitos no tratados. Se evaluó el TDP de ovocitos de MIV no tratados, con el fin de comprobar la efectividad de la pronasa en el momento de realizar el experimento, obteniendo valores próximos a los observados, para el mismo tipo de ovocitos, en otros experimentos.

**Tabla 3.10.** Reversibilidad del efecto del FO sobre el endurecimiento de la ZP bovina.

Tratamiento ovocitos bovinos	N	Tiempo digestión pronasa (s) (TDP)
30 min FO	25	4.301'1 ± 441'6 <sup>a</sup>
30 min FO + 15 min TALP	50	2.843'6 ± 234'3 <sup>b</sup>
30 min FO + 40 min TALP	49	2.816'1 ± 225'1 <sup>b</sup>
30 min FO + 60 min TALP	50	2.085'6 ± 241'2 <sup>b, c</sup>
30 min FO + 80 min TALP	47	1.933'7 ± 196'6 <sup>b, c</sup>
30 min FO + 100 min TALP	49	1.571'3 ± 143'7 <sup>b, c</sup>
30 min FO + 120 min TALP	57	1.385'6 ± 141'4 <sup>b, c</sup>
30 min FO + 160 min TALP	59	1.191'0 ± 124'6 <sup>b, c</sup>
30 min FO + 240 min TALP	64	1.410'5 ± 205'2 <sup>b, c</sup>
30 min FO + 300 min TALP	29	1.037'3 ± 130'9 <sup>c</sup>

**a, b, c.** Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ). **FO:** Fluido oviductal.

### 3.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LA ZP PORCINA PARA INDUCIR LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

#### 3.5.1. Experimento 11

Tras la incubación de los espermatozoides humanos y los ovocitos porcinos se observó la adhesión de un reducido número (10-20) de espermatozoides a la ZP. La evaluación de la RA de los espermatozoides adheridos, reveló que el porcentaje de RA fue significativamente mayor en este, que en los otros grupos. No se observaron diferencias significativas atribuibles al medio de incubación utilizado (TALP o IVF Medicult<sup>®</sup>), observándose para ambos medios porcentajes de inducción RA similares (TALP:  $38'6 \pm 5'4$ ; IVF Medicult<sup>®</sup>:  $38'0 \pm 5'0$ ), mientras que en los grupos sin ovocitos, los valores de RA eran similares a los obtenidos en el grupo control 0 h.

**Tabla 3.11.** Porcentajes de espermatozoides humanos con reacción acrosómica en muestras coincubadas con o sin (control) ovocitos porcinos en dos medios de cultivo diferentes.

Grupo	N	% RA
Control 0 h	6	$22'2 \pm 1'8^a$
Control 2'5 h IVF**	6	$23'7 \pm 6'0^a$
Control 2'5 h TALP	6	$24'7 \pm 1'5^a$
IVF 2'5 h Ovocitos MIV	6	$60'6 \pm 5'3^b$
TALP 2'5 h Ovocitos MIV	6	$63'2 \pm 5'7^b$

N: Número de microgotas evaluadas (conteniendo 15 ovocitos por microgota).

\*\* Medio IVF Medicult<sup>®</sup>.

a, b: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ).

#### 3.5.2. Experimento 12.

Utilizando el medio IVF (Medi-Cult ®Universal IVF) se observaron de nuevo diferencias en el % de RA de los espermatozoides adheridos a la ZP respecto a los grupos control. En el grupo con ovocitos sin ZP (IVF 2'5 h ovocitos MIV sin ZP) los valores de RA no mostraron diferencias significativas respecto a los grupos sin ovocitos. Sin embargo la RA si era significativamente diferente respecto al grupo con ovocitos completos (IVF 2'5 h ovocitos MIV completos), en el que se obtuvo una inducción de RA del  $33'6 \pm 3'7 \%$ .

Los datos obtenidos para el grupo "IVF 2'5 h ovocitos MIV completos", se representan individualmente en el Gráfico 3.1, observándose valores que oscilan entre el 15% y el 58% de reacción acrosómica inducida, según la muestra.

**Tabla 3.12.** Porcentajes de espermatozoides humanos con RA en muestras coincubadas con ovocitos porcinos (madurados *in vitro* y libres o no de ZP) o sin ovocitos (grupo control) en medio Medi-Cult ®Universal IVF.

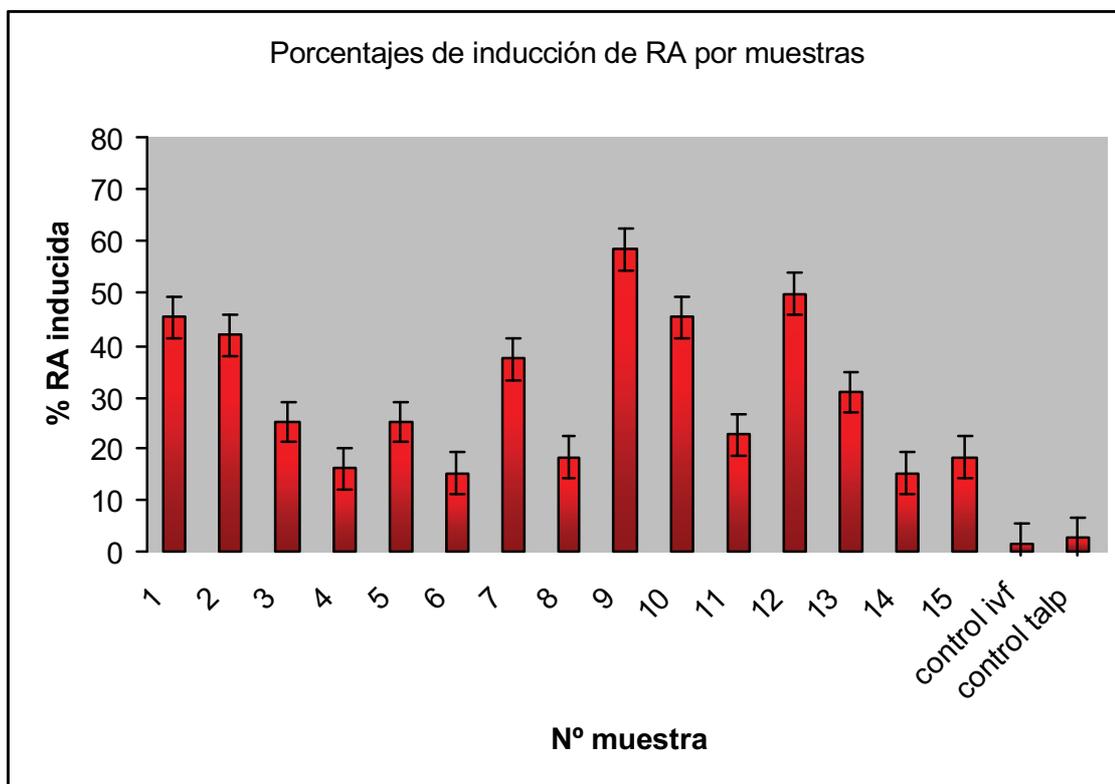
Grupo	N	% RA
Control 0 h	17	$23'5 \pm 3'6^a$
Control 2'5 h IVF**	19	$25'4 \pm 3'4^a$
IVF 2'5 h ovocitos MIV sin ZP	2	$21'0 \pm 8'5^a$
IVF 2'5 h ovocitos MIV completos	20	$55'7 \pm 3'8^b$

N: Número de microgotas evaluadas (conteniendo 15 ovocitos por microgota).

\*\* Medio IVF Medicult®.

a, b: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ).

**Gráfico 3.1.** Porcentaje de RA inducida mediante coincubación con ovocitos porcinos de 15 muestras de semen humano.



### 3.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PENETRACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS EN OVOCITOS PORCINOS SIN ZP

#### 3.6.1. Experimento 13

Tras la inseminación de los ovocitos porcinos sin ZP con espermatozoides humanos, con o sin inducción de RA según los grupos, se comprobó que no se produce fusión de los gametos heterólogos, bajo las condiciones utilizadas. De hecho, ninguno de los ovocitos porcinos libres de ZP fue penetrado por espermatozoides humanos, en ninguno de los grupos (Tabla 3.13). En algunos casos, se observaron espermatozoides adheridos al oolema, pero no se pudo demostrar la penetración al interior del ooplasma.

Ni la adición de progesterona ( $P_4$ ) o PFF al medio provocaron ningún efecto sobre la penetración. Tampoco la inducción de la RA con ionóforo de  $Ca^{2+}$ , afecta a esa variable (Tabla 3.13). Sin embargo se comprobó que la inducción de RA funcionó correctamente, observando valores de RA próximos al 75 % cuando se utilizó  $P_4$  o ionóforo de  $Ca^{2+}$  y del 45% cuando se utilizó el PFF, frente al 20% de RA espontánea del grupo control.

Por el contrario, se obtuvieron valores cercanos al 100% de penetración cuando se inseminaron ovocitos porcinos sin ZP con espermatozoides de cerdo, observando un elevado número de espermatozoides por ovocito (polispermia). Del mismo modo, la FIV convencional entre ovocitos y espermatozoides porcinos funcionó correctamente y se observó un alto porcentaje de penetración (86'3%) y de formación pronuclear (100%) (Tabla 3.13).

### 3.7. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS PARA FORMAR PRONÚCLEOS MASCULINOS TRAS SER INYECTADOS EN EL CITOPLASMA DE OVOCITOS PORCINOS

#### 3.7.1. Experimento 14

Cuando se evaluó el resultado de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) humanos en ovocitos porcinos a las 18 horas se pudo observar formación de pronúcleo masculino y femenino para todas las muestras de espermatozoides humanos empleadas, en diferentes porcentajes (Tabla 3.14). Además, se observaron también algunos ovocitos divididos en ese momento (18 horas post-inyección) en las muestras procedentes de donantes sanos.

**Tabla 3.13.** Resultados de penetración, formación pronuclear y monospermia después de la coincubación *in vitro* de espermatozoides humanos o porcinos con ovocitos porcinos con la ZP intacta o libres de ella.

Espermatozoides	RA inducida	Ovocitos MIV	Ovocitos (N)	Penetración (%)	PNM (%)	MON (%)
Humano	Ionóforo	Sin ZP	835	0	0	-
Humano	P <sub>4</sub>	Sin ZP	144	0	0	-
Humano	PFF	Sin ZP	86	0	0	-
Humano	No	Sin ZP	732	0	0	-
Cerdo	No	Sin ZP	140	98'6	100	9'7
Cerdo	No	Intacto	200	86'3	100	18'2
Humano	No	Intacto	75	0	0	-

**RA:** Reacción acrosómica

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**PFF:** Fluido folicular porcino

**N:** Número de ovocitos

**PNM:** Formación de pronúcleo masculino; se calcula sobre los ovocitos penetrados.

**MON:** Monospermia; se calcula sobre los ovocitos penetrados.

**Tabla 3.14.** Resultados de ICSI heteróloga con diferentes muestras de espermatozoides humanos y ovocitos porcinos, evaluado a las 18 horas tras la ICSI.

	<b>N</b>	<b>PNM (%)</b>	<b>PNF (%)</b>	<b>División (%)</b>	<b>Origen</b>
Muestra 1	9	63	45	0	Paciente
Muestra 2	7	75	100	0	Paciente
Muestra 3	11	77	77	0	Paciente
Muestra 4	10	100	66	0	Paciente
Muestra 5	10	87	75	0	Paciente
Muestra 6	12	58	75	0	Paciente
Muestra 7	5	40	40	0	Paciente
Muestra 8	11	54	64	0	Paciente
Muestra 9	14	93	100	4 (28'6)	Donante
Muestra 10	9	78	78	2 (22'2)	Donante
Muestra 11	9	89	89	3 (33'3)	Donante
Muestra 12	7	100	100	3 (42'9)	Donante

**N:** número de ovocitos inyectados.

**PNM:** formación de pronúcleo masculino; se calcula sobre los ovocitos inyectados.

**PNF:** formación de pronúcleo femenino; se calcula sobre los ovocitos inyectados.

## 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 aminos 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 secretan 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 Sinowitz, 1998; Sinowitz 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 (oplasma) 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.

## 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 aminos 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.

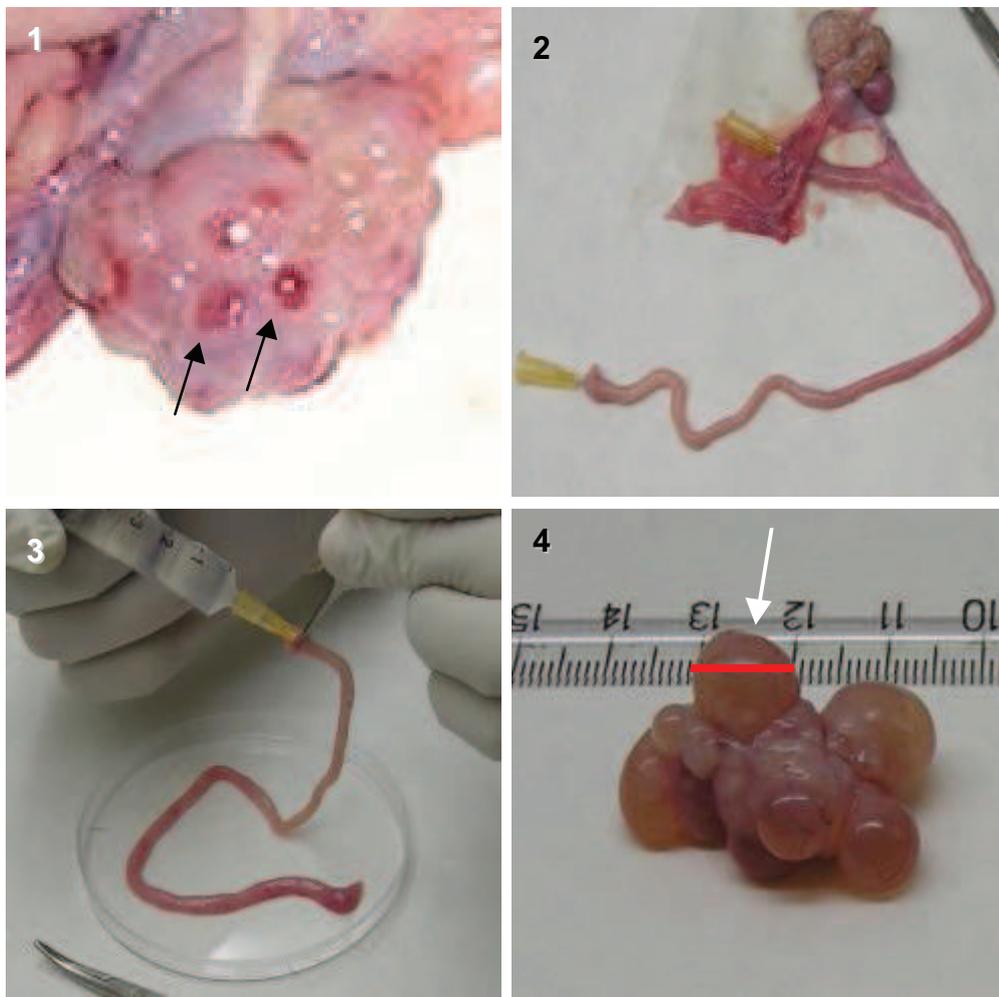
IVF results were significantly improved in pig after treatment with oviductal fluid, with a monospermy level of 29% compared to 8% in control group (under saturated sperm conditions). These results suggest that one of the reasons for the high levels of polyspermy under *in vitro* conditions can be the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

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

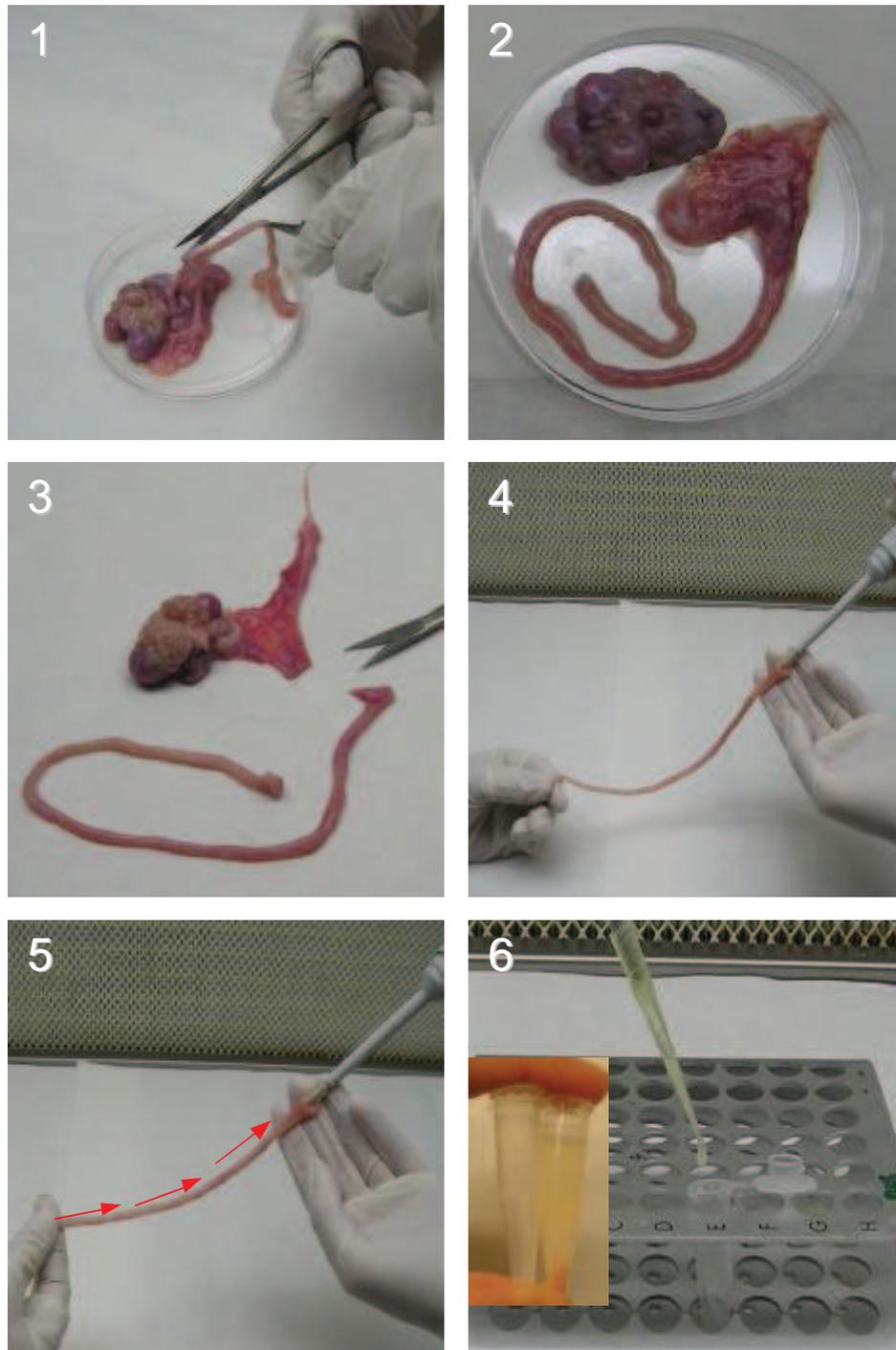
Experiments 11 to 14 studied the human sperm-pig oocyte interaction at the ZP, oolema and ooplasm levels. After 2.5 h coincubation, the ability of human sperm to bind to the pig ZP was assessed as well as the percentage of acrosome reaction in the bound sperm. The results showed that a reduced number 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).

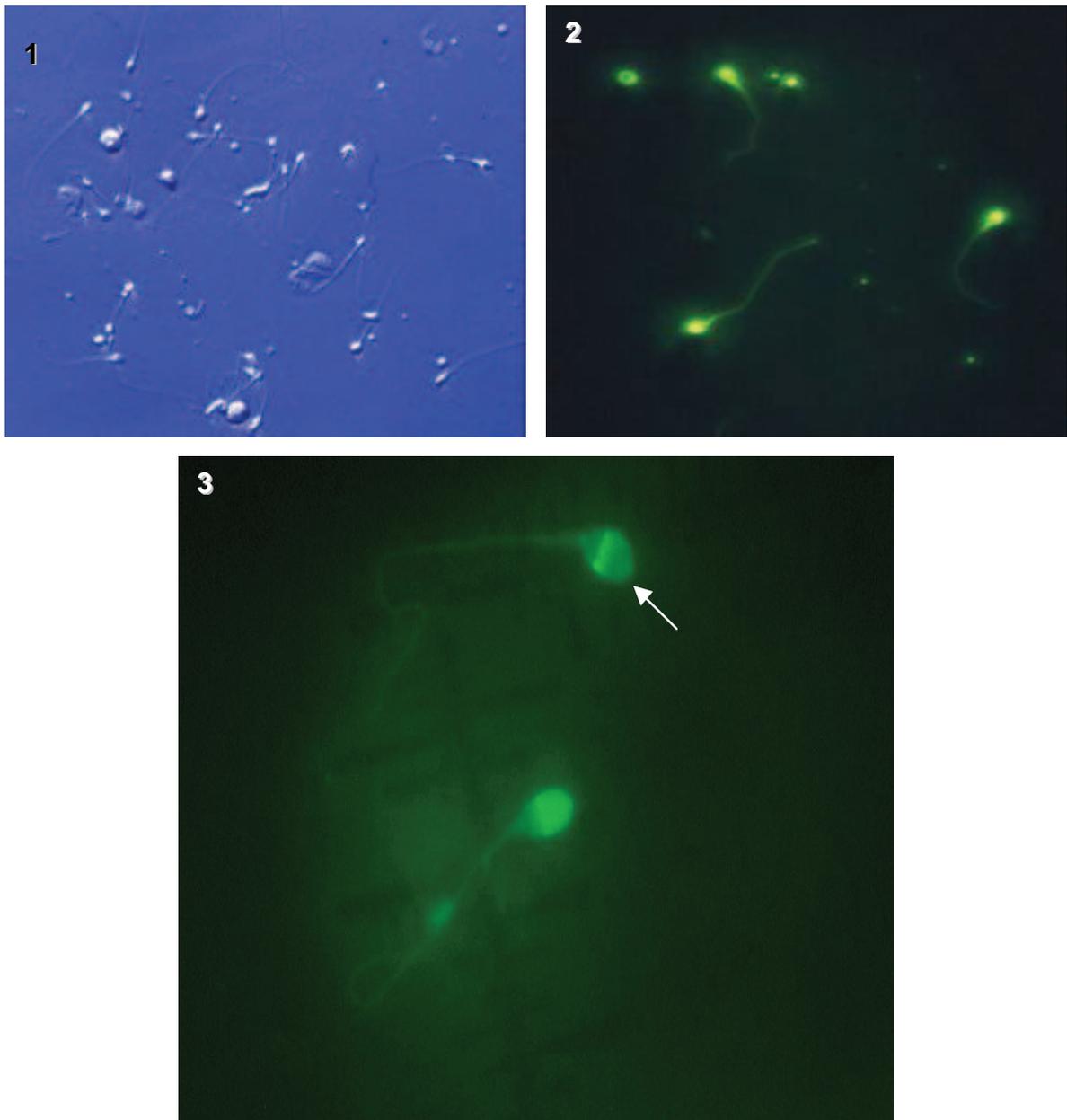
Finally, the interaction between human sperm and pig ooplasm was studied by ICSI (intracytoplasmic sperm injection). The results showed that human sperm can develop to male pronucleus when they are injected into pig oocytes and can activate the oocyte, since female pronucleus was also observed. Moreover,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



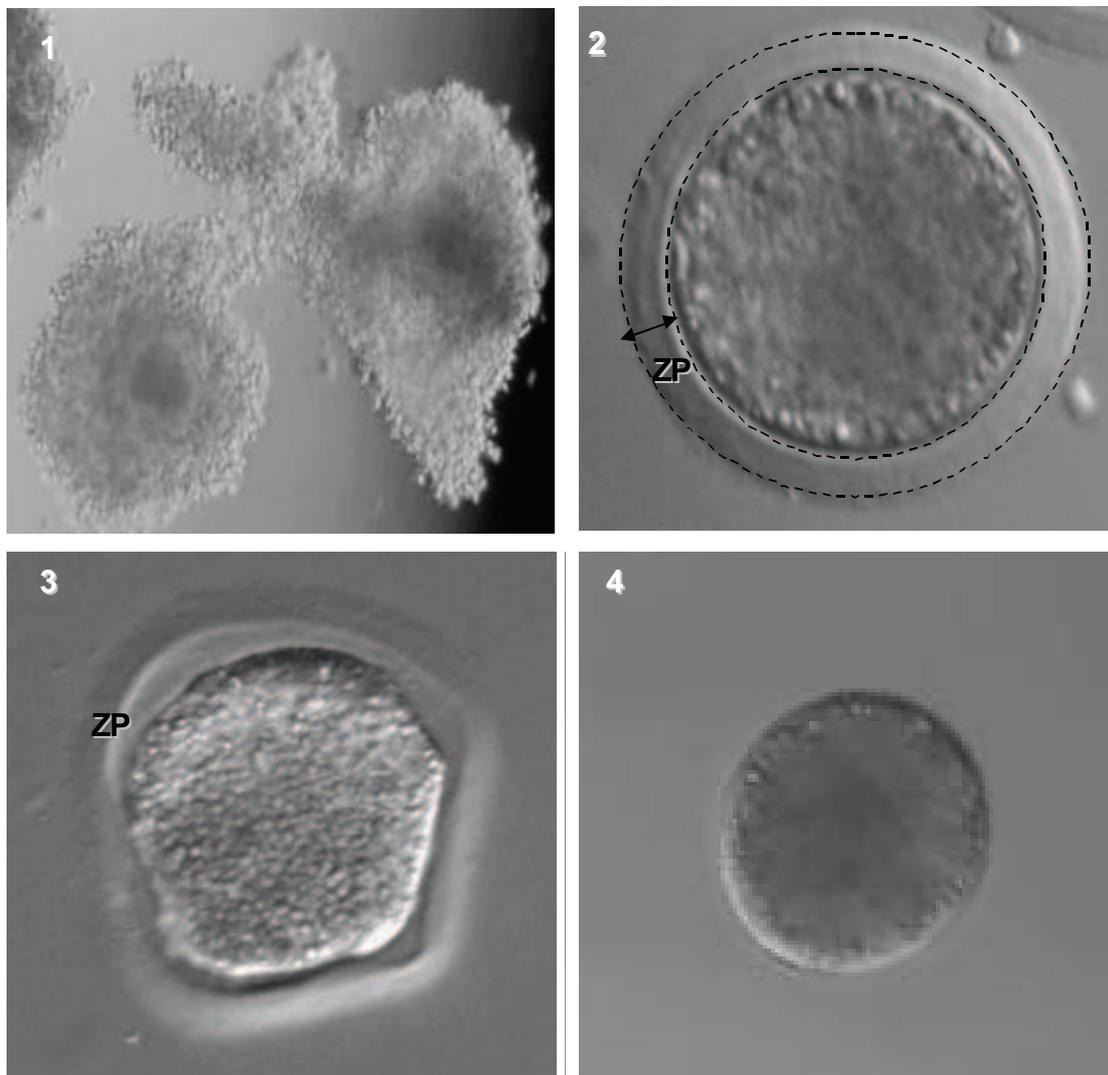
**Figura 6.** Obtención de ovocitos madurados *in vivo*. 1) Ovario porcino con puntos de ovulación recientes (flechas). 2) Oviducto aislado mostrando la apertura en la ampolla y el istmo (agujas). 3) Lavado oviductal para la recogida de los ovocitos *in vivo* recién ovulados (oviductales). 4) Ovario porcino con folículos de más de 10mm (flecha) conteniendo ovocitos madurados *in vivo* (foliculares).



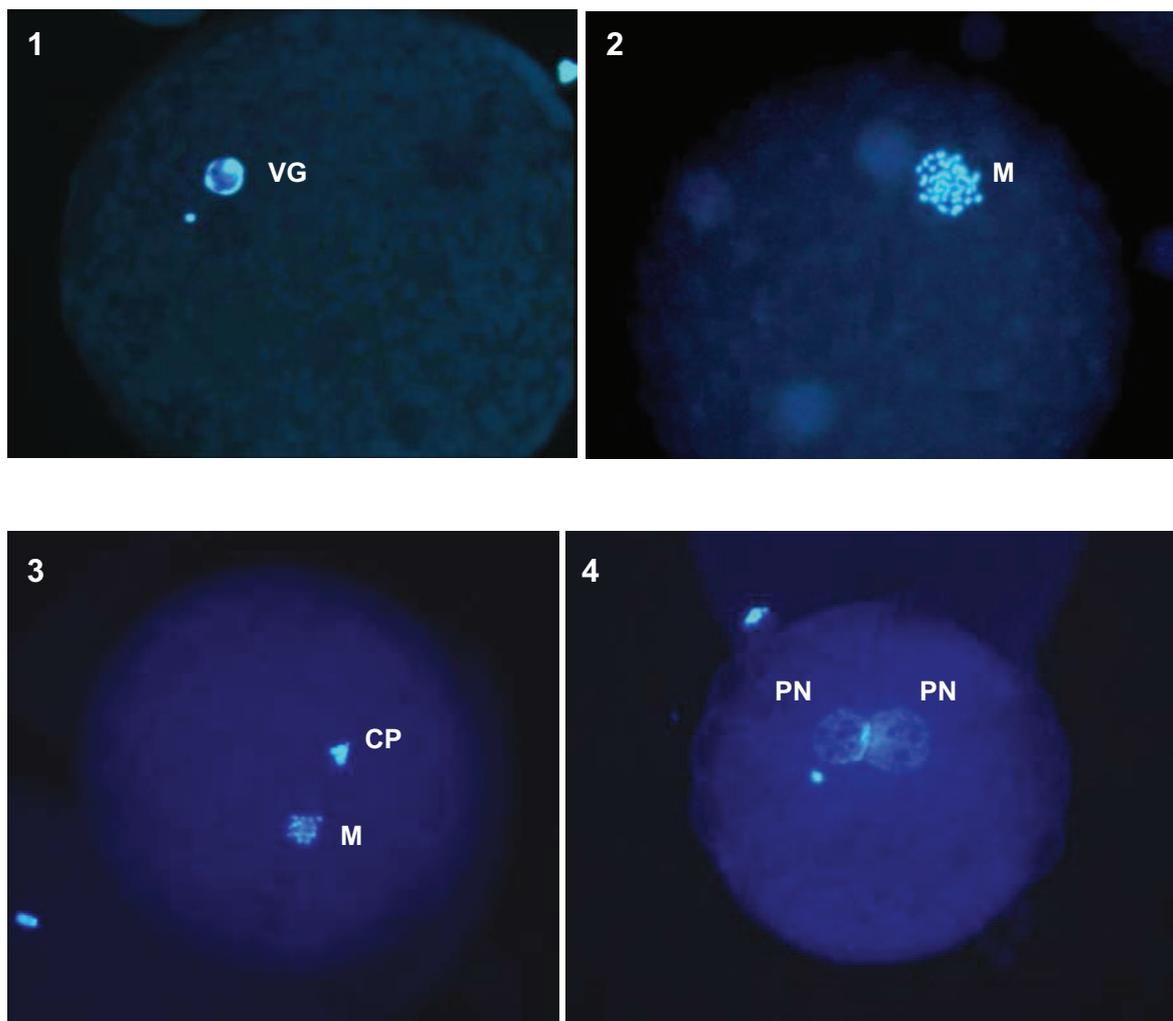
**Figura 7.** Obtención de fluido oviductal. 1), 2) y 3) Separación del ovario y disección del oviducto. 4) y 5) Aspiración del fluido oviductal mediante pipeta. 6) Detalle del fluido oviductal tras la centrifugación, donde se aprecia el sedimento de células.



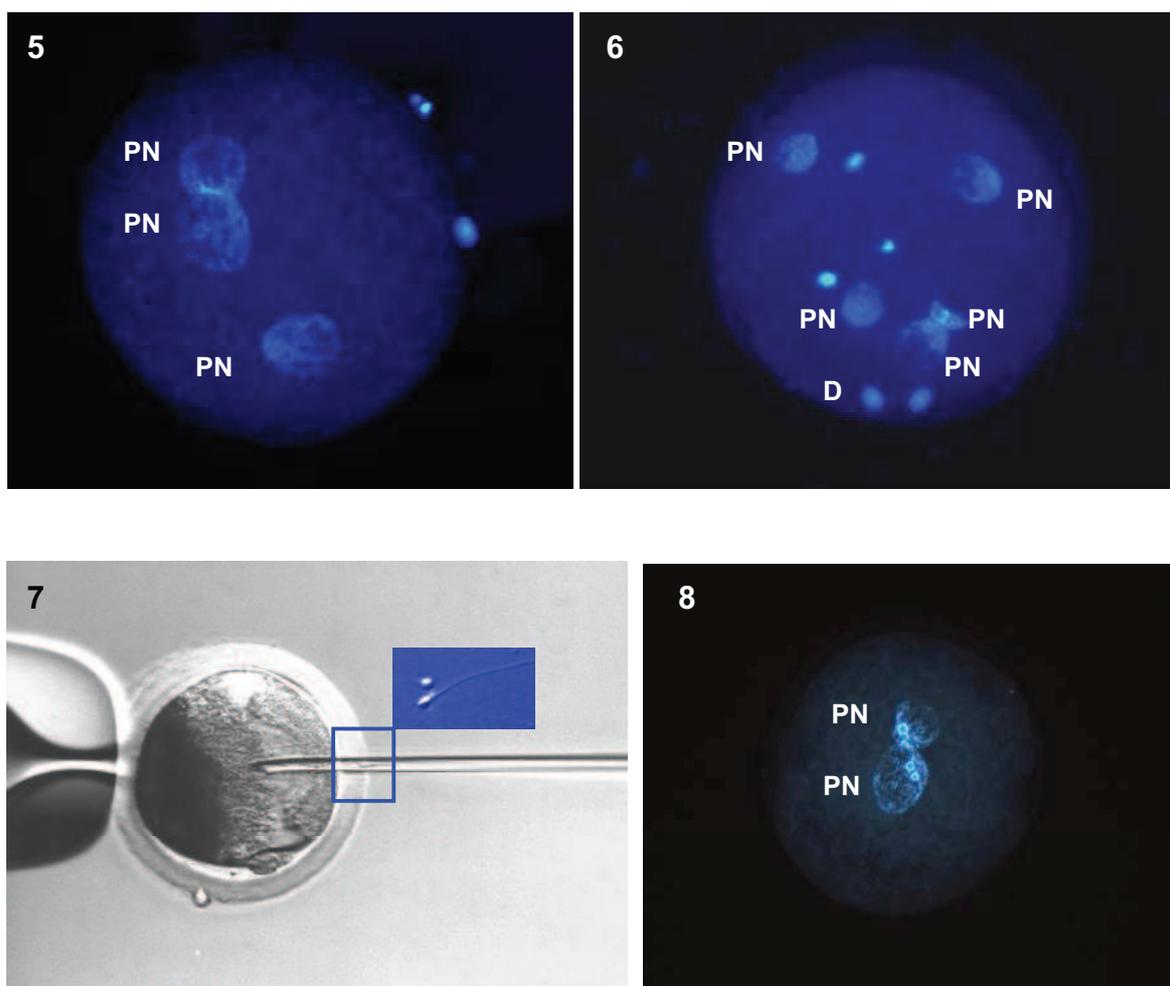
**Figura 9** Espermatozoides humanos. 1) Muestra de espermatozoides frescos visualizados al microscopio con óptica Hoffman. 2) Espermatozoides teñidos con PSA-FITC, observados con microscopio de fluorescencia, 40X y 3) Espermatozoides teñidos con PSA-FITC, observados con microscopio de fluorescencia, 100 X (aceite de inmersión). La flecha indica un espermatozoide con acrosoma reaccionado, junto a uno con acrosoma intacto.



**Figura 11.** Digestión de la zona pelúcida. 1) Ovocitos con células del *cumulus oophorus*. 2) Ovocito después de denudarlo donde se observa la ZP. 3) Ovocito en proceso de digestión de la ZP, con pronasa al 0'5%. 4) Ovocito sin ZP, tras la digestión con pronasa.



**Figura 12.** Evaluación en microscopio de fluorescencia de los ovocitos fijados (glutaraldehído 0'5%) y teñidos (Hoechst 33342 1mg/ml). 1) Ovocito en estadio de vesícula germinal (VG). 2) Ovocito en estadio de metafase donde se pueden apreciar los cromosomas dispuestos en la placa metafásica (M). 3) Ovocito en estadio de metafase II donde se pueden apreciar los cromosomas dispuestos en la placa metafásica (M) y el primer corpúsculo polar (CP). 4) Ovocito monospermico con dos pronúcleos (PN) tras ser fecundado *in vitro*.



**Figura 12 (continuación).** Evaluación en microscopio de fluorescencia de los ovocitos fijados (glutaraldehído 0'5%) y teñidos (Hoechst 33342 1mg/ml). 5) Ovocito polispérmico con tres pronúcleos (PN). 6) Ovocito polispérmico mostrando al menos cinco pronúcleos (PN) y espermatozoides descondensados (D) en el citoplasma. 7) Ovocito preparado para realizar una inyección intracitoplásmica de espermatozoide (ICSI). Detalle del espermatozoide en la micropipeta de inyección. 8) Ovocito procedente de ICSI mostrando dos pronúcleos (PN).

## 8. ABREVIATURAS

**AC:** adenilato ciclasa.

**ADAM:** “A Disintegrin And a Metalloprotease”.

**BSA:** albúmina sérica bovina (Bovine Serun Albumine).

**BTS:** Betswille Thawing Solution.

**CASA:** “Computer assisted sperm analysis”.

**CO:** *cumulus oophorus*.

**COC's:** complejos *cumulus oophorus*-ovocito.

**CTC:** chlortetraciclina

**CHO:** “cellular hamster ovary”.

**DABCO:** 1,4-diacibiciclo-octano.

**DAG:** diacilglicerol.

**dbAMPc :** dibutiril adenil monofosfato cíclico.

**DCFH-DA:** 2',7diclorofluoresceína diacetato.

**DTSP:** di(N-succinimidil)3,3'-ditiodipropionato Dithiobis(succinimidil propionato).

**EPV:** espacio perivitelino.

**FIV:** fecundación *in vitro*.

**FO:** fluido oviductal

**GABA:** ácido gamma amino-butírico

**Gal T:** galactosiltransferasa.

**GPI:** licosilfosfatidilinositol.

**HCG:** gonadotropina coriónica humana (Human Corionic Gonadotropin).

**HESPA:** zona-free hamster egg sperm penetration assay.

**HSA:** albúmina sérica humana (Human Serun Albumine).

**ICSI:** microinyección intracitoplasmática.

**IP<sub>3</sub>:** inositoltrifosfato.

**MDC:** metalloprotease Disintegrin Cysteine-rich.

**MIV:** maduración *in vitro*.

**OCM:** medio de recogida de ovocitos (Oocytes Collection Medium).

**PBS:** tampón fosfato salino de Dulbecco modificado (Phosphate Buffer Saline).

**PFF:** fluido folicular porcino (Porcine follicular fluid).

**PHE:** epinefrina-hipotaruina-penicilamina.

**PIP<sub>2</sub>:** fosfoinositol bifosfato.

**PLA, PLC, PLD:** fosfolipasas A, C, y D.

**PMSG:** gonadotropina coriónica de yegua gestante (Pregnant Mare Serum Gonadotropin).

**PNA:** Peanut agglutinin

**PSA:** Pissum sativum agglutinin

**PVA:** polivinil alcohol.

**RA:** reacción acrosómica.

**ROS:** especies oxígeno reactivas (“reactive oxigen species”).

**S:** segundos

**SFB:** suero fetal bovino.

**SSF:** solución salina fisiológica.

**SUZI:** inyección espermática subzonal.

**TALP:** medio de Tyrodes con albúmina, lacta y piruvato (Tyrodes Albumin Lactate Pyruvate).

**TDP:** tiempo de digestión con pronasa

**ZP:** zona pelúcida.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abeydeera LR (2002). In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 57:256-273.
- Agarwal A, Allamaneni SSR (2005). Alteraciones de la cromatina espermática en la etiopatogenia de la infertilidad masculina. *Rev Int Androl* 3:31-37.
- Agarwal A, Said TM (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9:331-345.
- Ahmadi A, Bongso A, Ng SC (1996). Intracytoplasmic injection of human sperm into the hamster oocyte (hamster ICSI assay) as a test for fertilizing capacity of the severe male-factor sperm. *J Assist Reprod Genet* 13:647-651.
- Ahmadi A, Ng SC (1999). Destruction of protamine in human sperm inhibits sperm binding and penetration in the zona-free hamster penetration test but increases sperm head decondensation and male pronuclear formation in the hamster-ICSI assay. *J Assist Reprod Genet* 16:128-132.
- Aitken RJ, Thatcher S, Glasier AF, Clarkson JS, Wu FC, Baird DT (1987). Relative ability of modified versions of the hamster oocyte penetration test, incorporating hyperosmotic medium or the ionophore A23187, to predict IVF outcome. *Hum Reprod* 2:227-231.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41:183-197.
- Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC (1991). Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164:542-551.
- Aitken RJ (1997). Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 3:169-173.
- Aitken RJ (2006). Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 29:69-75. .
- Alfieri JA, Martin AD, Takeda J, Kondoh G, Myles DG, Primakoff P (2003). Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J Cell Sci* 116:2149-2155.
- Amari S, Yonezawa N, Mitsui S, Katsumata T, Hamano S, Kuwayama M, Hashimoto Y, Suzuki A, Takeda Y, Nakano M (2001). Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 59:221-226.
- Amin AH, Bailey JL, Storey BT, Blasco L, Heyner S (1996). A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod* 11:741-745.
- Anderson RA, Feathergill KA, Waller DP, Zaneveld LJ (2006). SAMMA induces premature human acrosomal loss by Ca<sup>2+</sup> signaling dysregulation. *J Androl* 27:568-577.
- Austin CR (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res* 4:581-596.
- Austin CR (1952). The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170:326.
- Austin CR, Braden AW (1956) Early reaction of the rodent egg to spermatozoon penetration. *J Exp Biol* 33:358-365.
- Aviles M, Martinez-Menarguez JA, Castells MT, Madrid JF, Ballesta J (1994). Cytochemical characterization of oligosaccharide side chains of the glycoproteins of rat zona pellucida: an ultrastructural study. *Anat Rec* 239:137-149.
- Aviles M, Abasacal I, Martinez-Menarguez JA, Castells MT, Skalaban SR, Ballesta J, Alhadef J (1996). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma

membrane-associated, neutral pH optimum  $\alpha$ L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa. *Biochem J* 318: 821-831.

Aviles M, Jaber L, Castells MT, Ballesta J, Kan FW (1997). Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol Reprod* 57:1155-1163.

Aviles M, Castells MT, Abascal I, Martinez-Menarguez JA, Draber P, Kan FW, Ballesta J (1999). Cytochemical localization of GalNAc and GalNAc $\beta$ 1,4Gal $\beta$ 1,4 disaccharide in mouse zona pellucida. *Cell Tissue Res* 295:269-277.

Aviles M, Okinaga T, Shur BD, Ballesta J (2000). Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 57:296-308.

Avrech O, Fisch B, Shalgi R (1997). Acrosomal status of human spermatozoa after follicular fluid or calcium ionophore challenge in relation to semen parameters and fertilizing capacity in vitro. *Andrologia* 29:97-101.

Ballachey BE, Evenson DP, Saacke RG (1988). The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl* 9:109-115.

Barratt CL, Osborn JC, Harrison PE, Monks N, Dunphy BC, Lenton EA, Cooke ID (1989). The hypo-osmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. *Hum Reprod* 4:430-444.

Barros C, Yanagimachi R (1972). Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J Exp Zool* 180:251-265.

Bastiaan HS, Menkveld R, Oehninger S, Franken DR (2002). Zona pellucida induced acrosome reaction, sperm morphology, and sperm-zona binding assessments among subfertile men. *J Assist Reprod Genet* 19:329-334.

Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR (2003). Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 79:49-55.

Bastiaan H, Franken D (2007). The influence of homogenous zona pellucida on human spermatozoa hyperactivation, acrosome reaction and zona binding. *Andrologia* 39:7-11.

Bedford JM (1977). Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anat Rec* 188:477-87.

Bedford JM, Moore HDM, Franklin LE (1979). Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res* 119:119-126.

Bedford JM (1998). Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 59:1275-1287.

Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Hershlag A, Scholl GM, Rosenfeld DL (1993). Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod* 8:2155-2166.

Benoff S (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod* 3:599-637.

Ben-Yosef D, Shalgi R (2001). Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med* 7:163-169.

Berger T, Horton MB (1988). Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. *Gamete Res* 19:101-11.

- Berger T (1989). Development of a zona-free hamster ova bioassay for goat sperm. *Theriogenology* 32:69-77.
- Berger T, Davis A, Wardrip NJ, Hedrick JL (1989). Sperm binding to the pig zona pellucida and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 86:559-565.
- Bergqvist AS, Ballester J, Johannisson A, Hernandez M, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H (2006). In vitro capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote* 14:259-273.
- Berridge MJ, Irvine RF (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197-205.
- Betteridge KJ (2006). Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. *Theriogenology* 65:905-913.
- Berridge MJ (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200:315-319.
- Bielanski A, Lutze-Wallace CL, Nadin-Davis S (2003). Adherence of bovine viral diarrhoea virus to bovine oocytes and embryos with a hardened zona pellucida cultured in vitro. *Can J Vet Res* 67:48-51.
- Bigler D, Takahashi Y, Chen MS, Almeida EA, Osbourne K, White JM (2000). Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin  $\beta$ ) ymurine eggs. Role of the  $\alpha_6$  integrin subunit. *J Biol Chem* 275:11576.
- Bleil JD, Wassarman PM (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873-882.
- Bleil JD, Wassarman PM (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* 102:1363-1371.
- Bleil JD, Wassarman PM (1990). Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *PNAS USA* 87:5563-5567.
- Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356:248-252.
- Boettger-Tong HL, Aarons DJ, Biegler BE, George B, Poirier GR (1993). Binding of a murine proteinase inhibitor to the acrosome region of the human sperm head. *Mol Reprod Dev* 36:346-353.
- Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG (1990). Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* 43:457-465.
- Boja ES, Hoodbhoy T, Fales HM, Dean J (2003). Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *J Biol Chem* 278:34189-34202.
- Bousquet D, Brackett BG (1982). Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage. *Theriogenology* 17:199-213.
- Bray C, Son JH, Kumar P, Harris JD, Meizel S (2002). A role for the human sperm glycine receptor/Cl(-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod* 66:91-97.
- Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y (1997). Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod* 2:165-174.
- Breitbart H (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 22:139-144.
- Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S (2005). Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129:263-268.

- Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD (1996). Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2:583-589.
- Brewis IA, Morton IE, Moore HD, England GC (2001). Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mol Reprod* 60:491-497.
- Broermann DM, Xie S, Nephew KP, Pope WF (1989). Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *J Anim Sci* 67:1324-1329.
- Brown CR, Cheng WK (1986). Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 92:183-191.
- Buhi WC, Ashworth CJ, Bazer FW, Alvarez IM (1992). In vitro synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. *J Exp Zool* 262:426-435.
- Buhi WC, O'Brien B, Alvarez IM, Erdos G, Dubois D (1993). Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod* 48:1274-1283.
- Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ (1997). Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 52:285-300.
- Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* 166:165-179.
- Buhi WC (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123:355-362.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 19:1401-1408.
- Burgoyne RD, Morgan A (1995). Ca<sup>2+</sup> and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci* 18:191-196.
- Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Krugen TF, Rosenwaks Z, Hogen GD (1988). The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 49:688-697.
- Calvo L, Vantman D, Banks SM, Tezon J, Koukoulis GN, Dennison L, Sherins RJ (1989). Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil Steril* 52:1048-1054.
- Camaioni A, Salustri A, Yanagishita M, Hascall V (1996). Proteoglycans and proteins in the extracellular matrix of mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Arch Biochem Biophys* 325:190-198.
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF (2003). CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *PNAS* 100:14864-14868.
- Carrasco LC, Romar R, Aviles M, Coy P (2007). Enzymatic activity level of different glycosidases in bovine oviductal fluid at different stages of the estrous cycle. 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Kyoto (Japan). *Reproduction, Fertility and Development*.
- Chakravarty S, Suraj K, Gupta S (2005). Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod* 11:365-3672.

Chang MC (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.

Chen L, Zhang H, Powers RW, Russell PT, Larsen WJ (1996). Covalent link-age between proteins of the inter- $\alpha$ -inhibitor family yhyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. *J Biol Chem* 271:19409-19414.

Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC, White JM (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin  $\alpha 6 \beta 1$ : implications for murine fertilization. *PNAS* 96:11830-11835.

Chen XY, Li QW, Zhang SS, Han ZS, Zhao R, Wu SY, Huang J (2006). Effects of ovarian cortex cell co-culture during in vitro maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci.* Jun 16;

Cheng A, Le T, Palacios M, Bookbinder LH, Wassarman PM, Suzuki F, Bleil JD (1994). Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol* 125:867-78.

Cherr GN, Lambert H, Meizel S, Katz DF (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev Biol* 114:119-131.

Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281:1857-1859.

Choudhry TM, Berger T, Dally M (1995). In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. *Theriogenology* 43:1195-1200.

Clark GF, Dell A (2006). Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* 281:13853-13856.

Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicu PS (2000). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod* 63:462-468.

Conley AJ, Howard HJ, Slanger WD, Ford JJ (1994). Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biol Reprod* 51:655-61.

Cook SP, Brokaw CHA, Muller CH, Babcock D (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol* 165:10-19.

Coy P, Gadea J, Romar R, Matas C, Garcia E (2002). Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction* 124:279-288.

Coy P, Romar R (2002). In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fertil Dev* 14:275-86.

Coy P, Romar R, Payton RR, McCann L, Saxton AM, Edwards JL (2005a). Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction* 129:19-26.

Coy P, Romar R, Ruiz S, Canovas S, Gadea J, Garcia Vazquez F, Matas C (2005b). Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. *Reproduction* 129:747-755.

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1988). Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 38:235-244.

Cross NL, Hanks SE (1991). Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod* 6:1279-1283.

- Cross NL (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:7-11.
- Cuasnicu PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG (2001). Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch Med Res* 32:614-618.
- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE (1991). A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 12:98-103.
- D'Cruz OJ, Haas GG (1993). The expression of the complement regulators CD46, CD55, and CD59 by human sperm does not protect them from antisperm antibody- and complement-mediated immune injury. *Fertil Steril* 59:876-884.
- De Jonge CJ, Barratt CL, Radwanska E, Cooke ID (1993). The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl* 14:359-365.
- de Lamirande E, Gagnon C (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 10 Suppl 1:15-21.
- de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3:175-194.
- Dean J (2004). Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* 26:29-38.
- Dell A, Chalabi S, Easton RL, Haslam SM, Sutton-Smith M, Patankar MS, Lattanzio F, Panico M, Morris HR, Clark GF (2003). Murine and human zona pellucida 3 derived from mouse eggs express identical O-glycans. *PNAS* 100:15631-15636.
- Delle Monache S, Flori F, Della Giovampaola C, Capone A, La Sala GB, Rosati F, Colonna R, Tatone C, Focarelli R (2003). Gp273, the ligand molecule for sperm-egg interaction in the bivalve mollusk, *Unio elongatulus*, binds to and induces acrosome reaction in human spermatozoa through a protein kinase C-dependent pathway. *Biol Reprod* 69:1779-1784.
- DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS (1995). Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 52:1395-1403.
- Dimitriadou F, Rizos D, Mantzavinos T, Arvaniti K, Voutsina K, Prapa A, Kanakas N (1995). The effect of pentoxifylline on sperm motility, oocyte fertilization, embryo quality, and pregnancy outcome in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 63:880-886.
- Ducibella T, Duffy P, Buetow J (1994). Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 50:467-473.
- Ducibella T, Dubey A, Gross V, Emmi A, Penzias A, Layman L, Reindollar R (1995). A zona biochemical change and spontaneous cortical granule loss in eggs that fail to fertilize in vitro fertilization *Fert Steril* 64:1154-1161.
- Dunbar BS, Wolgemuth DO (1984). Structure and function of the mammalian zona pellucida, a unique extracellular matrix. En: *Modern Cell Biology, Volumen 3*. B.H. Satir, (edit) New York: Alan R. Liss, Inc., pags. 77-111.
- Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel D, Skinner S, Wilkins B (1994). The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod Fert Dev* 6:331-347.
- Eberspaecher U, Barros C (1984). Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gamete Res* 9:387-397.
- Edwards JL, Hansen PJ (1996). Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol Reprod* 55:341-346.

- Emiliozzi C, Cordonier H, Guerin JF, Ciapa B, Benchaib M, Fenichel P (1996). Effects of progesterone on human spermatozoa prepared for in-vitro fertilization. *Int J Androl* 19:39-47.
- Ensslin MA, Shur BD (2003). Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 114:405-417.
- Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Van Rooyen LH (2001) Clinical importance of zona pellucida induced acrosome reaction (ZIAR test) in cases of failed human fertilization. *Hum Reprod* 16:138–144.
- Evans JP (1999). Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Frontiers in Bioscience* 4:114-131.
- Evans JP (2001). Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* 23:628-639.
- Evans JP (2002). The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update* 8:297-311.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210:1131-1133.
- Evenson DP, Thompson L, Jost L (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41:637-651.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14:1039-1049.
- Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S (2006). Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc Res Tech*.69:415-26.
- Fazeli AR, Steenweg W, Bevers MM, de Loos FA, van den Broek J, Colenbrander B (1993). Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet Rec* 132:14-16.
- Fazeli AR, Steenweg W, Bevers MM, van den Broek J, Bracher V, Parlevliet J, Colenbrander B (1995). Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. *Theriogenology* 44:751-760.
- Fazeli A, Hage WJ, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B (1997). Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod* 56:430-438.
- Fenichel P, Hsi BL, Farahifar D, Donzeau M, Barrier-Delpech D, Yehy CJ (1989). Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *J Reprod Fertil* 87:699-706.
- Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL (1991). Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 55:994-999.
- First NL, Parrish JJ (1987). In-vitro fertilization of ruminants. *J Reprod Fertil Suppl* 34:151-165.
- Florman HM, Wassarman PM (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 41:313-324.
- Florman H, Ducibella T (2006). Fertilization in mammals. In: Neill JD (ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. London: Elsevier; 2006: 55-112.
- Focarelli R, Capone A, Ermini L, Del Buono F, Battista La Sala G, Balasini M, Rosati F (2003). Immunoglobulins against gp273, the ligand for sperm-egg interaction in the mollusc bivalve *Unio elongatulus*, are directed against charged O-linked oligosaccharide chains bearing a Lewis-like structure and interact with epitopes of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 64:226-234.

- Foerder CA, Shapiro BM (1977). Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *PNAS* 74:4214-4218.
- Franken DR, Kruger TF, Menkveld R, Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD (1990). Hemizona assay and teratozoospermia: increasing sperm insemination concentrations to enhance zona pellucida binding. *Fertil Steril* 54:497-503.
- Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC (2000). Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet* 17:156-161.
- Fraser LR (1992). Requirements for successful mammalian sperm capacitation and fertilization. *Arch Pathol Lab Med* 116:345-350.
- Fraser LR (1995). Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 10 Suppl 1:22-30.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995). ( $Ca^{2+}$ )-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
- Fraser LR (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* 13 Suppl 1:9-19.
- Fraser L, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale R, Gibbons R (2006). Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci* 11:1636-45.
- Funahashi H, Day BN (1993). Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* 99:97-103.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN (1997). Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic AMP improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 57:49-53.
- Funahashi H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H (2000). Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* 63:1437-1442.
- Funahashi H (2003). Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reprod Fertil Dev* 15:167-177.
- Funahashi H, Romar R (2004). Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pretreatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. *Reproduction* 128:789-800.
- Gaddum-Rosse P (1985). Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs?. *Am J Anat* 174:347-356.
- Gadea J, Matas C (2000). Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 54:1343-1357.
- Gadea J, Gumbao D, Matas C, Romar R (2005). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J Androl* 26:749-756.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M (2004). Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 19:1409-1417.
- Garcia-Rosello E, Matas C, Canovas S, Moreira PN, Gadea J, Coy P (2006). Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J Androl* 27:268-275.
- Gardner AJ, Evans JP (2006). Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev* 18:53-61.

- Gardner AJ, Williams CJ, Evans JP (2007). Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and -independent regulation. *Reproduction* 133:383-393.
- Gardon JC, Matas C, Coy P, Gadea J (2001). Fecundación interespecífica de ovocitos porcinos con espermatozoides bovinos como método de evaluación espermática. *Rev Iberoam Fértil* 18:56-57.
- Gould-Somero M, Jaffe LA, Holland LZ (1979). Electrically mediated fast polyspermy block in eggs of the marine worm, *Urechis caupo*. *J Cell Biol* 82:426-440.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43:55-64.
- Green DP (1987). Mammalian sperm cannot penetrate the zona pellucida solely by force. *Exp Cell Res* 169:31-38.
- Green DP (1993). Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum Reprod* 8:91-96.
- Green DP (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction* 2:147-156.
- Greve LC, Prody GA, Hedrick JL (1985). N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in the cortical granules of *Xenopus laevis* eggs. *Gamete Res* 12:305-312.
- Griveau JF, Renaud P, Le Lannou D (1994). An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17:300-307.
- Griveau JF, Renaud P, Le Lannou D (1995). Superoxide anion production by human spermatozoa as part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int J Androl* 18:67-74.
- Gutierrez-Lopez MD, Ovalle S, Yanez-Mo M, Sanchez-Sanchez N, Rubinstein E, Olmo N, Lizarbe MA, Sanchez-Madrid F, Cabanas C (2003). A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J Biol Chem* 278:208-218.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C et al. (2001). Sperm morphology, motility y concentration in fertile y infertile men. *N Engl J Med* 345:1388-1393.
- Hafez ESE (2000). Fecundación y segmentación. En Hafez ESE (ed.), reproducción e inseminación artificial en animales, 7<sup>o</sup> ed. México: Interamericana.MC Graw-Hill; 8:113-127.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan J (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
- Hanada A, Chang MC (1976). Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J Reprod Fertil* 46:239-241.
- Hanada A, Chang MC (1978). Penetration of the zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro. *J Exp Zool* 203:277-285.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li W, Critser J, Prather RS (2006). Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* 75:726-733.
- Hardy DM, Garbers DL (1994). Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular matrix (zona pellucida) of the egg. *J Biol Chem* 269:19000-19004.
- Harper CV, Publicover SJ (2005). Reassessing the role of progesterone in fertilization-- compartmentalized calcium signalling in human spermatozoa?. *Hum Reprod* 20:2675-2680.

- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG (1994). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq* 4:361-93.
- Hartmann JF (1983). Mammalian fertilization: gamete surface interactions in vitro. In: Hartmann, JF (ed.), *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Academic Press, New York, 325–364.
- He ZY, Brakebusch C, Fassler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG (2003). None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol* 254:226-237.
- Hedrick JL, Wardrip NJ (1987). On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev Biol* 121:478-488.
- Henkel R, Muller C, Miska W, Gips H, Schill WB (1993). Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 8:2128-2132.
- Henley N, Baron C, Roberts KD (1994). Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *Int J Androl* 17:78-84.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Cell Physiol* 202:663-671.
- Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol* 202:663-671.
- Herrler A, Beier HM (2000). Early embryonic coats: morphology, function, practical applications. An overview. *Cells Tissues Organs*. 166:233-246.
- Hewitson L, Haavisto A, Simerly C, Jones J, Schatten G (1997). Microtubule organization and chromatin configurations in hamster oocytes during fertilization and parthenogenetic activation, and after insemination with human sperm. *Biol Reprod* 57:967-975.
- Hoodbhoy T, Talbot P (1994). Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 39:439-448.
- Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J (2005). Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem* 280:12721-12731.
- Hoshi K, Sugano T, Endo C, Yoshimatsu N, Yanagida K, Sato A (1993). Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. *Fertil Steril* 60:149-153.
- Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A (1996). The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 66:634-639.
- Hoshiba H, Sinowatz F (1998). Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anat Histol Embryol* 27:351-353.
- Huang TTF, Yanagimachi R (1985). Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am J Anat* 174:249-268.
- Hunter RHF (1990). Fertilization of pig eggs in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil (suppl)* 40:211-226.
- Hunter RH (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 29:385-391.
- Hunter RH, Rodriguez-Martinez H (2004). Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol Reprod Dev* 67:243-250.

- Hunter RH (2005). The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 45:281-90.
- Hyttel P, Viuff D, Laurincik J, Schmidt M, Thomsen PD, Avery B, Callesen H, Rath D, Niemann H, Rosenkranz C, Schellander K, Ochs RL, Greve T (2000). Risks of in-vitro production of cattle and swine embryos: aberrations in chromosome numbers, ribosomal RNA gene activation and perinatal physiology. *Hum Reprod (Suppl)* 5:87-97.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434:234-238.
- Ivanova M, Mollova M (1993). Zona-penetration in vitro test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology* 40:397-410.
- Ivic A, Onyeaka H, Girling A, Brewis IA, Ola B, Hammadih N, Papaioannou S, Barratt CL (2002). Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Hum Reprod.* 17:143-149.
- Iwamoto K, Ikeda K, Yonezawa N, Noguchi S, Kudo K, Hamano S, Kuwayama M, Nakano M (1999). Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: evidence for the involvement of cystine cross-linkages in hardening of the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 117:395-402.
- Jaffe LA, Cross NL (1984). Electrical properties of vertebrate oocyte membranes. *Biol Reprod* 30:50-54.
- Jahn R, Grubmuller H (2002). Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Aug;14(4):488-95.
- Jang S, Yi LS (2005). Identification of a 71 kDa protein as a putative non-genomic membrane progesterone receptor in boar spermatozoa. *J Endocrinol* 184:417-425.
- Jimenez-Movilla M, Aviles M, Gomez-Torres MJ, Fernandez-Colom PJ, Castells MT, de Juan J, Romeu A, Ballesta J (2004). Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Hum Reprod* 19:1842-1855.
- Jury JA, Frayne J, Hall L (1997). The human fertilin alpha gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem J* 321:577-581.
- Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A (2002). Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol* 247:327-334.
- Kaji K, Kudo A (2004). The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127:423-429.
- Kim K, Mitsumizo N, Fujita K, Utsumi K (1996). The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology* 45:787-799.
- Kim NH, Jun SH, Do JT, Uhm SJ, Lee HT, Chung KS (1999). Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 53:84-91.
- Kim KS, Cha MC, Gerton GL (2001) Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol Reprod* 64:36-43.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T (2005). Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *PNAS* 102:18028-18033.
- Kirkman-Brown JC, Lefievre L, Bray C, Stewart PM, Barratt CL, Publicover SJ (2002). Inhibitors of receptor tyrosine kinases do not suppress progesterone-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 8:326-332.

- Kolbe T, Holtz W (2005). Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 63:1695-1705.
- Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Buhi WC (2000). Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic Biol Reprod 63:242-50.
- Kouba AJ, Atkinson MW, Gandolf AR, Roth TL (2001). Species-specific sperm-egg interaction affects the utility of a heterologous bovine in vitro fertilization system for evaluating antelope sperm. *Biol Reprod* 65:1246-1251.
- Koukoulis GN, Vantman D, Dennison L, Banks SM, Sherins RJ (1989). Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity, or linearity. *Fertil Steril* 52:120-127.
- Lambert H, Steinleitner A, Eisermann J, Serpa N, Cantor B (1992). Enhanced gamete interaction in the sperm penetration assay after incubation with pentoxifylline and human follicular fluid. *Fertil Steril* 58:1205-1208.
- Lanzendorf SE, Holmgren WJ, Johnson DE, Scobey MJ, Jeyendran RS (1992). Hemizona assay for measuring zona binding in the lowland gorilla. *Mol Reprod Dev* 31:264-267.
- Lapointe S, Sirard MA (1996). Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 44:234-240.
- Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 15:1717-1722.
- Lee MA, Trucco GS, Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT (1987). Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil Steril* 48:649-658.
- Lee MA, Storey BT (1989). Endpoint of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> permeability: population and single cell kinetics. *Gamete Res* 24:303-326.
- Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R (1996). Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 11:1942-1946.
- Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CLR (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod* 19:1580-1586.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67:142-147.
- Lewis WH, Wright ES (1935). On the early development of the mouse egg. *Carnegie Inst. Contrig. Embryol.* 25, 113-143.
- Leyton L, Saling PM (1989). Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* 108:2163-2168.
- Li YH, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH, Wang WH (2003). Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new in vitro fertilization (IVF) system: straw IVF. *Biol Reprod* 69:1580-1585.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 125:1157-1163.

- Lindsay LL, Hedrick JL (2004). Proteolysis of *Xenopus laevis* egg envelope ZPA triggers envelope hardening. *Biochem Biophys Res Commun* 324:648-654.
- Litscher ES, Wassarman PM (2007). Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol* 22:337-347.
- Liu DY, Lopata A, Johnston WI, Baker HW (1988). A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertil Steril* 50:782-788.
- Liu DY, Lopata A, Pantke P, Baker HW (1991). Horse and marmoset monkey sperm bind to the zona pellucida of salt-stored human oocytes. *Fertil Steril* 56:764-767.
- Liu DY, Baker HW (1992). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 58:465-483.
- Liu DY, Baker HW (1996a). A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 11:551-557.
- Liu DY, Baker HW (1996b). Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertil Steril* 66:312-315.
- Liu DY, Baker HW (1998). Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Hum Reprod* 13:905-910.
- Liu DY, Baker HW (2003). Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril* 79:74-80.
- Liu DY, Garrett C, Baker HW (2004). Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril* 82:1251-1263.
- Loffler S, Lottspeich F, Lanza F, Azorsa DO, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J (1997). CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol* 71:42-49.
- Lopez LC, Bayna EM, Litoff D, Shaper NL, Shaper JH, Shur BD (1985). Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J Cell Biol* 101:1501-1510.
- Losel R, Dorn-Beineke A, Falkenstein E, Wehling M, Feuring M (2004). Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1532-1541.
- Macedo MC Jr, Deschamps JC, Lucia T Jr, Bordignon J, Serret CG, Rambo G, Pivato I, Schmitt E (2006). In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Anim Reprod Sci* 92:334-348.
- Macomber D, Sanders MB (1929). The spermatozoa count: its value in the diagnosis, prognosis, and treatment of sterility. *N Engl J Med* 200:981
- Maluchnik D, Borsuk E (1994). Sperm entry into fertilized mouse eggs. *Zygote* 2:129-131.
- Martic M, Moses EK, Adams TE, Liu DY, Gook DA, Garrett C, Dunlop ME, Baker GH (2004). Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J Androl* 6:3-13.
- Martinez E, Vazquez JM, Matas C, Roca J, Coy P, Gadea J (1993). Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40:547-557.

- Matas C, Martinez E, Vazquez JM, Roca J, Gadea J (1996). In vitro penetration assay of boar sperm fertility: Effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology* 46:503-513.
- McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamaño JN, Didion BA, Day BN (2003). Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization In Vitro. *Biol Reprod* 69:828-834.
- McHugh JA, Rutledge JJ (1998). Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of the genus *Bos*. *Theriogenology* 50:185-193.
- Meizel S, Turner KO (1991). Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 77:1-5.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 54:449-60.
- Meyers SA, Rosenberger AE (1999). A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod* 61:444-451.
- Michelmann HW, Bonhoff A, Mettler L (1986). Chromosome analysis in polyploid human embryos. *Hum Reprod* 1:243-246.
- Miller DJ, Macek MB, Shur BD (1992). Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357:589-593.
- Miller DJ, Gong XH, Decher G, Shur BD (1993). Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cell Biol* 123:1431-1440.
- Miller DJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG (2000). Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 is CD9-dependent. *J Cell Biol* 149:1289-1296.
- Miller DJ, Shi X, Burkin H (2002). Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res* 57:37-73.
- Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287:321-324.
- Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y (1993). Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 158:62-78.
- Moller CC, Wassarman PM (1989). Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 132:103-112.
- Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM (1990). Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol* 137:276-286.
- Morales P, Cross NL, Overstreet JW, Hanson FW (1989). Acrosome intact and acrosome-reacted human sperm can initiate binding to the zona pellucida. *Dev Biol* 133:385-392.
- Morales P, Vigil P, Franken DR, Kaskar K, Coetzee K, Kruger TF (1994). Sperm-oocyte interaction: studies on the kinetics of zona pellucida binding and acrosome reaction of human spermatozoa. *Andrologia* 26:131-137.
- Mori E, Yoshitani N, Mori T, Takasaki S (2000). Calcium ion-independent recognition of sialyl and nonsialyl N-acetyllactosamine and Le(x) structures by boar sperm. *Arch Biochem Biophys* 374:86-92.

- Mortillo S, Wassarman PM (1991). Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane components. *Development* 113:141-149.
- Moseley FL, Jha KN, Bjorndahl L, Brewis IA, Publicover SJ, Barratt CL, Lefievre L. (2005). Protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and progesterone-induced acrosome reaction are enhanced in IVF media: an effect that is not associated with an increase in protein kinase A activation. *Mol Hum Reprod* 11:523-529.
- Muller CH (2000). Rationale interpretation, validation and uses of sperm function tests. *Journal of Andrology* 21:10-30.
- Myles DG, Hyatt H, Primakoff P (1987). Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Dev Biol* 121:559-567.
- Myles DG, Kimmel LH, Blobel CP, White JM, Primakoff P (1994). Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *PNAS USA* 91:4195-4198.
- Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K (2006). Up date of in vitro production of porcine embryos. *Front Biosci* 11:2565-2573.
- Naish SJ, Perreault SD, Zirkin BR (1987). DNA synthesis following microinjection of heterologous sperm and somatic cell nuclei into hamster oocytes. *Gamete Res* 18:109-120.
- Nakamura S, Terada Y, Horiuchi T, Emuta C, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K (2001). Human sperm aster formation and pronuclear decondensation in bovine eggs following intracytoplasmic sperm injection using a Piezo-driven pipette: a novel assay for human sperm centrosomal function. *Biol Reprod* 65:1359-1363.
- Nakano M, Yonezawa N (2001). Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs* 168:65-75. .
- Naz RK, Ahmad K, Kumar R (1991). Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J Cell Sci* 99:157-165.
- Ni Y, Li K, Xu W, Song L, Yao K, Zhang X, Huang H, Zhang Y, Shi QX (2006). Acrosome reaction induced by recombinant human zona pellucida 3 peptides rhuZP3a22~176 and rhuZP3b177~348 and their mechanism. *J Androl*. Dec 27.
- Nichols J, Gardner RL (1989). Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum Reprod* 4:180-187.
- Niemann H, Rath D, Wrenzycki C (2003). Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reprod Domest Anim* 38:82-89.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P (2001). Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 233:204-213.
- Nixon B, Lu Q, Wassler MJ, Foote CI, Ensslin MA, Shur BD (2001). Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:46-57.
- Noguchi S, Hatanaka Y, Tobita T, Nakano M (1992). Structural analysis of the N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur J Biochem* 204:1089-1100.
- Noguchi S, Nakano M (1992). Structure of the acyclic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur J Biochem* 209:883-894.
- Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M (1994). Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta* 1201:7-14.

- Nolan JP, Hammerstedt RH (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11:670-682.
- Oehninger S, Mahony MC, Swanson JR, Hodgen GD (1993). The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemizona assay conditions. *Mol Reprod Dev* 35:57-61.
- Oehninger S, Blackmore P, Morshedi M, Sueldo C, Acosta AA, Alexander NJ (1994). Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil Steril* 61:349-354.
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, Kolm P (2000). Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 6:160-168.
- Ogawa S, Araki S, Araki Y, Ohno M, Sato I (2000). Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligoasthenozoospermic carrier for a 13;14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 15:1136-1139.
- Okitsu O, Yamano S, Aono T (2001). Activation of bovine oocytes matured in vitro by injection of bovine and human spermatozoa or their cytosolic fractions. *Zygote* 9:89-95.
- Olds-Clarke P (1989). Sperm from t w32/+ mice: capacitation is normal, tub pyperactivation is premature and nonhyperactivated sperm are slow. *Dev Biol* 131:475-482.
- O'Rand MG, Matthews JE, Welch JE, Fisher SJ (1985). Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human, and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J Exp Zool* 235:423-428.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 160:828-833.
- Ostling O, Johanson KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298.
- Pampiglione JS, Tan SL, Campbell S (1993). The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil Steril* 59:1280-1284.
- Parinaud J, Labal B, Vieitez G (1992). High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertil Steril* 58:599-602.
- Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoille G, Labal B (1995). Relevance of acrosome function in the evaluation of semen in vitro fertilizing ability. *Fertil Steril* 63:598-603.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38:1171-1180.
- Pavlok A (1980). Interaction of the plasma membrane of mouse, rat and hamster oocytes with human spermatozoa in vitro. *Folia Biol (Praha)*. 26:188-193.
- Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR (2004). Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril* 81 1:850-856.
- Perry RL, Barratt CL, Warren MA, Cooke ID (1996). Comparative study of the effect of human cervical mucus and a cervical mucus substitute, Healonid, on capacitation and the acrosome reaction of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 11:1055-1062.
- Phillips DM, Shalgi RM (1980). Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J Ultrastruct Res* 72:1-12.
- Pilikian S, Guerin JF, Adeleine P, Ecochard R, Czyba JC (1992). Spontaneous and ionophore induced acrosome reaction in asthenozoospermic infertile semen. *Hum Reprod* 7:991-993.

- Prather RS, Day BN (1998). Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology*. 49:23-32.
- Primakoff P, Hyatt H (1986). An antisperm monoclonal antibody inhibits sperm fusion with zona-free hamster eggs but not homologous eggs. *Fertil Steril* 46:489-493.
- Primakoff P, Myles DG (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296:2183-215.
- Purvis K, Rui H, Scholberg A, Hesla S, Clausen OP (1990). Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J Androl* 11:361-366.
- Putney JW (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611-624.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *PNAS* 100:14869-14874.
- Quinn P (1979). Failure of human spermatozoa to penetrate zona free mouse and rat ova in vitro. *J Exp Zool* 210:497-505.
- Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126:3847-3855.
- Rankin T, Dean J (2000). The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 5:114-121.
- Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J (2003). Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 5:33-43.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA (1999). In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77:3346-3352.
- Rath D, Topfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S (2005). Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology*. 63:352-362.
- Rath D, Topfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, von Witzendorff D, Ebeling S, Ekhlasi-Hundrieser M, Piehler E, Petrunkina A, Romar R (2006). Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. *Soc Reprod Fertil Suppl* 62:317-330.
- Redkar AA, Olds-Clarke PJ (1999). An improved mouse sperm-oocyte plasmalemma binding assay: studies on characteristics of sperm binding in medium with or without glucose. *J Androl* 20:500-508.
- Relucanti M, Heyn R, Correr S, Familiari G (2005). Cumulus oophorus extracellular matrix in the human oocyte: a role for adhesive proteins. *Ital J Anat Embryol* 110(2 Suppl 1):219-224.
- Rockwell PL, Storey BT (2000). Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca(2+) changes monitored by fluo-3. *Mol Reprod Dev* 55:335-349.
- Rodeheffer C, Shur BD (2004). Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development* 131:503-512.
- Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl* 58:129-145.

- Roldan ER, Murase T, Shi QX (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266:1578-1581.
- Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J, Matas C, Ruiz S (2001). Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. *Anim Reprod Sci* 68:85-98.
- Romar R, Coy P, Gadea J, Rath D (2005). Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 85:287-300.
- Romar R, Carrasco LC, Aviles M, Coy P (2007). Enzymatic activity level of different glycosidases in porcine oviductal fluid at different stages of the estrous cycle. 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Kyoto (Japan). *Reproduction, Fertility and Development*.
- Roth TL, Weiss RB, Buff JL, Bush LM, Wildt DE, Bush M (1998). Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biol Reprod* 58:475-482.
- Roth TL, Bush LM, Wildt DE, Weiss RB (1999). Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine *in vitro* fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapor. *Biol Reprod* 60:493-498.
- Rybouchkin A, Dozortsev D, de Sutter P, Qian C, Dhont M (1995). Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. *Hum Reprod* 10:1130-1135.
- Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC (1992). Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 151:541-551.
- Saudek V, Atkinson RA, Pelton JT (1991). Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein. *Biochem J* 30:7369-7372.
- Schatten G, Simerly C, Schatten H (1991). Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polyspermy in mice. *PNAS USA* 88:6785-6789.
- Schill WB (1974). Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa. *Fertil Steril* 25:703-712.
- Schill WB (1991). Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Hum Reprod* 6:969-978.
- Schmell ED, Gulyas BJ (1980). Mammalian sperm-egg recognition and binding in vitro. I. Specificity of sperm interactions with live and fixed eggs in homologous and heterologous inseminations of hamster, mouse, and guinea pig oocytes. *Biol Reprod* 23:1075-1085.
- Schuffner AA, Bastiaan HS, Duran HE, Lin ZY, Morshedi M, Franken DR, Oehninger S (2002). Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod* 8:722-727.
- Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Horikawa M, Ishikawa M (2004). Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion. *Hum Reprod* 19:639-644.
- Shalgi R, Raz T (1997). The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histol Histopathol* 12:813-822.
- Sharara FI, Illions EH, Coddington CC 3rd, Scott RT (1995). Evaluation of the Tru-Trax cervical mucus penetration test in predicting fertilization and pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 10:1481-1485.

- Shur BD, Rodeheffer C, Ensslin MA (2004). Mammalian fertilization. *Curr Biol* 14:691-692.
- Shur BD, Rodeheffer C, Ensslin MA, Lyng R, Raymond A (2006). Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Mol Cell Endocrinol* 250:137-148.
- Sikka SC (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 25:5-18.
- Simerly C, Wu GJ, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z (1995). The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med* 1:47-52.
- Sinowatz F, Kolle S, Topfer-Petersen E (2001a). Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* 168:24-35
- Sinowatz F, Plendl J, Kolle S (1998). Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anat (Basel)* 161:196-205.
- Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Koller S, Palma G (2001). Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol* 5:257-263.
- Sinowatz F, Wessa E, Neumuller C, Palma G (2003). On the species Specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod Dom Anim* 38:141-146.
- Slavik T, Pavlok A, Fulka J (1990). Penetration of intact bovine ova with ram sperm in vitro. *Mol Reprod Dev* 25:345-347.
- Slavik T, Fulka J (1992). In vitro fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. *Theriogenology* 38:721-6.
- Slavik T, Fulka J (1999). Oviduct secretion contributes to the establishment of species specific barrier preventing penetration of oocytes with foreign spermatozoa. *Folia Biol (Praha)* 45:53-58.
- Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 11:1655-1660.
- Soderquist L, Rodriguez-Martinez H, Janson L (1991). Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A. I. bull spermatozoa in relation to fertility. *Zbl Vet Med A* 38:165-174.
- Spargo SC, Hope RM (2003). Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol Reprod* 68:358-362.
- Spungin B, Margalit I, Breitbart H (1995). Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Cell Sci* 108:2525-2535.
- Sun QY (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 61:342-348.
- Staros AL, Killian GJ (1998). In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *Reprod Fertil* 112:131-137.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the master zona pellucida. *Biol Reprod* 53:1280-1285.
- Stein KK, Primakoff P, Myles D (2004). Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci* 117:6269-6274.
- Strom Holst B, Larsson B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (2000). Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J Reprod Fertil* 119:77-83.

- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 56:602-607.
- Takahashi K, Wetzels AM, Goverde HJ, Bastaans BA, Janssen HJ, Rolland R (1992). The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 57:889-894.
- Talbot P, Chacon RS (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 215:201-208.
- Talbot P, Chacon RS (1982). Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona pellucida-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 37:240-248.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 68:1-9.
- Terada Y, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G (2000). Sperm aster formation and pronuclear decondensation during rabbit fertilization and development of a functional assay for human sperm. *Biol Reprod* 62:557-563.
- Terada Y, Nakamura S, Morita J, Tachibana M, Morito Y, Ito K, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K (2004a). Use of Mammalian eggs for assessment of human sperm function: molecular and cellular analyses of fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *Am J Reprod Immunol* 51:290-293.
- Terada Y, Nakamura S, Simerly C, Hewitson L, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K, Schatten G (2004b). Centrosomal function assessment in human sperm using heterologous ICSI with rabbit eggs: a new male factor infertility assay. *Mol Reprod Dev* 67:360-365.
- Tesarik J (1985). Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J Reprod Fertil* 74:383-388.
- Tesarik J (1989). Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum Reprod* 4:957-961.
- Tesarik J, Mendoza C (1993). Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. *Fertil Steril* 60:141-148.
- Tesarik J, Mendoza C (1995). Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk. *Fertil Steril* 63:153-157.
- Thaler CD, Cardullo RA (1996). The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J Biol Chem* 271:23289-23297.
- Thibier M (2006). Biosecurity and the various types of embryos transferred. *Reprod Domest Anim* 41:260-267.
- Toshimori K, Saxena DK, Tanii I, Yoshinaga K (1998). An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm-oocyte fusion in mice. *Biol Reprod* 59:22-29.
- Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N, Shalgi R (2006). When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol* 252:107-114.
- van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 51:607-617.
- Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Domest Anim* 37:144-151.

- Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52:1067-1078.
- Vatzias G, Hagen DR (1999). Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 60:42-48.
- Velasquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jimenez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Aviles M, Coy P (2006). Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev* 74:617-628.
- Visconti PE, Kopf GS (1998). Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biol Reprod* 59:1-6.
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214:429-443.
- Wakayama T, Uehara T, Hayashi Y, Yanagimachi R (1997). The response of mouse oocytes injected with sea urchin spermatozoa. *Zygote* 5:229-234.
- Wang W, Hosoe M, Li R, Shioya Y (1997). Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Dev Growth Differ* 39:607-615.
- Wang W, Abeydeera L, Prather R, Day B (1998) Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 49:308-316.
- Wang WH, Day BN, Wu GM (2003). How does polyspermy happen in mammalian oocytes?. *Microsc Res Tech* 61:335-341.
- Wassarman PM (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57:415-442.
- Wassarman PM, Albertini D (1994). The mammalian ovum. En: Knobil E y Neill JD. *The Physiology of Reproduction*. Vol 1: Cap. 3.
- Wassarman PM (1999). Fertilization in animals. *Dev Genet* 25:83-86.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol* 3:59-64.
- Wassarman PM, Litscher ES (2001). Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:36-45.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES, Qi H, Williams Z (2004). Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115 Suppl 1:S57-60.
- Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES (2005). Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol*. 234:95-103.
- Way AL, Schuler AM, Killian GJ (1997). Influence of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on sperm-egg binding and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil* 109:95-101.
- Wegner CC, Killian GJ (1991). In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 29:77-84.
- Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DO (2006). Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology* 65:219-227.

WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction (1999). 4<sup>a</sup> Edicion Corporate Author World Health Organisation. En: Cambridge University Press.

Williams CHA (2002). Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod Update* 8:313-321.

Windt ML, de Beer PM, Franken DR, Kruger TF, Bouic PJ (1992). The influence of solubilized porcine zona pellucida protein on the binding capacity of human spermatozoa. *Hum Reprod* 7:1150-1153.

Wolf DP (1974). The cortical response in *Xenopus laevis* ova. *Dev Biol* 40:102-115.

Wolf DP, Hamada M (1977). Induction of zonal and egg plasma membrane blocks to sperm penetration in mouse eggs with cortical granule exudate. *Biol Reprod* 17:350-354.

Wolf DP, Armstrong PB (1978). Penetration of the zona-free mouse egg by capacitated epididymal sperm: cinemicrographic observations. *Gamete Res* 1:39-46.

Wong JL, Wessel GM (2006). Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. *Curr Top Dev Biol* 72:1-151.

Wortzman GB, Evans JP (2005). Membrane and cortical abnormalities in post-ovulatory aged eggs: analysis of fertilizability and establishment of the membrane block to polyspermy. *Mol Hum Reprod*. 11:1-9.

Xu X, Ding J, Seth PC, Harbison DS, Foxcroft GR (1995). In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology* 43:358 (abstr).

Yanagida K, Yanagimachi R, Perreault SD, Klinefild RG (1991). Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod* 44:440-447.

Yanagimachi R (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil* 18:275-286.

Yanagimachi R, Noda YD (1970). Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm yegg cells. *J Ultrastruct Res* 31:486-493.

Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ (1976). The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15:471-476.

Yanagimachi R (1988). Sperm-egg fusion. *Curr Top Membr Transp* 32:3-43.

Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press; 189-317.

Yonezawa N, Mitsui S, Kudo K, Nakano M (1997). Identification of an N-glycosylated region of pig zona pellucida glycoprotein ZPB that is involved in sperm binding. *Eur J Biochem* 248:86-92.

Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M (2001). Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem* 268:3587-3594.

Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y (1992). Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fertil* 95:481-488

Yoshimatsu N, Yanagimachi R, Lopata A (1988). Zonae pellucidae of salt-stored hamster and human eggs: their penetrability by homologous and heterologous spermatozoa. *Gamete Res* 21:115-126.

Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA (1998). Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 273:7488-7494.

Zahalsky MP, Zoltan E, Medley N, Nagler HM (2003). Morphology and the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 79:39-41.

Zaneveld LJ, Anderson RA, Mack SR, De Jonge CJ (1993). Mechanism and control of the human sperm acrosome reaction. *Hum Reprod* 8:2006-2008.

Zhao XM, Songa XX, Kawai Y, Niwa K (2002). Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. *Theriogenology* 58:995-1006.

Zhu X, Naz RK (1999). Comparison of ZP3 protein sequences among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Front Biosci* 4:212-215.

Zhu X, Evans JP (2002). Analysis of the roles of RGD-binding integrins, alpha(4)/alpha(9) integrins, alpha(6) integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. *Biol Reprod* 66:1193-1202.

Ziyyat A, Naud-Barriant N, Barraud-Lange V, Chevalier F, Kulski O, Lemkecher T, Bomsel M, Wolf JP (2005). Cyclic FEE peptide increases human gamete fusion and potentiates its RGD-induced inhibition. *Hum Reprod* 20:3452-3458.