

UTILIZACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS PARA LA PREDICCIÓN DE LA FERTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

S. Cánovas¹, E. García-Roselló¹, E. Gómez², E. Sellés², P. Coy¹

¹Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

²Clínica IVI-MURCIA. Navegante Macías del Poyo, 5. La Flota 30007-Murcia
e-mail: scber@um.es <http://www.um.es/grupo-fisiovet>

INTRODUCCIÓN

Predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides, ha sido el objetivo de numerosos autores. Algunos se plantean si es alcanzable o es una utopía. Desde luego, son numerosas las técnicas que intentan evaluar la funcionalidad de esta célula altamente especializada, aunque ninguna se considera perfecta por no simular en su totalidad el proceso de la fecundación. El test de hámster, descrito por Yanagimachi en 1976 (1), consiste en un bioensayo que mide la capacidad de espermatozoides de diferentes especies, a los que se les induce la reacción acrosómica, para fusionarse y penetrar ovocitos de hámster libres de zona pelúcida (ZP). Se ha usado ampliamente en la especie humana (2) debido a las limitaciones que tiene la utilización de ovocitos humanos en los tests homoespecíficos y se ha adaptado a un número importante de especies: roedores, conejo, porcino, vacuno, equino, caprino, ovino y felinos.

Este test estudia parte de los procesos implicados en la fecundación, como son la capacitación espermática, capacidad de sufrir la reacción acrosómica (RA) tras la inducción con ionóforo de calcio, la unión y fusión a la membrana plasmática del ovocito y la descondensación de la cabeza espermática (3). No obstante, este test obvia dos procesos importantes: la unión y la penetración de la ZP. Esta última fase parece ser una de las barreras más difíciles que el espermatozoide debe atravesar antes de conseguir la penetración del ovocito. La realización del test de hámster implica disponer de animales específicamente para este fin, infraestructuras y personal, para la cría y mantenimiento, lo que ha contribuido a que caiga en desuso en la actualidad. Debido en parte a la relativa facilidad de conseguir ovarios porcinos en matadero, los ovocitos porcinos han sido utilizados previamente tanto en test homólogos (4) como en test heterólogos (5) para intentar predecir capacidad fecundante.

Nuestro propósito fue investigar si es posible usar como material biológico ovocitos procedentes de cerdas sacrificadas en mataderos para realizar un test heterólogo de penetración de espermatozoides humanos que permita predecir su capacidad fecundante. Además estudiamos si los espermatozoides microinyectados en el interior del ovocito porcino maduro tienen capacidad de descondensar y activar el ovocito, debido al interés actual de predecir si una muestra seminal puede fecundar mediante ICSI a pesar de que no sea capaz de hacerlo mediante FIV y la posibilidad de estudiar los eventos post-ICSI que acontecen en el espermatozoide y en el ovocito.

Este proyecto cuenta con la autorización de la Comisión Nacional de Reproducción Asistida y el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovarios de cerda se obtuvieron en matadero a partir de cerdas prepúberes y se transportaron al laboratorio a 39°C en solución salina. En el laboratorio se obtuvieron los ovocitos mediante rayado de los folículos entre 3-6mm y se seleccionaron bajo lupa por el número de capas de células del *cúmulus* y la homogeneidad del citoplasma, para transferirlos al medio de maduración NCSU-37 durante 44 horas (6).

Experiencia I. Al finalizar el proceso de maduración los ovocitos porcinos se desnudaron y se procedió a la digestión de la ZP con pronasa (7).

Previamente a la incubación con los ovocitos, los espermatozoides humanos fueron capacitados mediante un gradiente de densidad (Pure Sperm) y a continuación la muestra se dividió en dos partes. Una fracción se incubó durante 3 horas con 5µM de ionóforo de calcio A23187 en medio IVF y la otra sin ionóforo. Tras la incubación los espermatozoides fueron centrifugados y lavados dos veces en el medio TALP (8). Los ovocitos libres de ZP y los espermatozoides se coincubaron en medio TALP o medio IVF (Medicult) durante 18-20 horas a 38.5°C y 5% CO₂ usando diferentes concentraciones de espermatozoides (1x 10⁵, 1x10⁶, 5x10⁶ and 10x10⁶ espermatozoides/ml).

Antes de la coincubación, una alícuota de la muestra seminal fue teñida con PSA-FITC y se determinó el estado del acrosoma (9). Finalmente, los ovocitos se lavaron en DPBS y se fijaron en 0.5% glutaraldehído y se tiñeron con Bisbenzimidaz (Hoechst- 33342) para valorar unión de espermatozoides, penetración, descondensación de espermatozoides y el estado nuclear del ovocito.

Experiencia II. Los ovocitos porcinos maduros fueron desnudados en DPBS con 10% suero fetal bovino. Se prepararon las placas con las microgotas donde se colocaron los ovocitos y se procedió a la microinyección. Cinco muestras seminales, capacitadas mediante un gradiente de densidad (Pure-Sperm) fueron utilizadas. Diez ovocitos maduros por muestra seminal fueron inyectados con un solo espermatozoide. Tras la inyección los ovocitos fueron lavados dos veces en DPBS y transferidos a medio TALP durante 18-20 horas. Tras ese tiempo, se fijaron y tiñeron del mismo modo antes descrito.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Experiencia I. Los ovocitos porcinos libres de zona pelúcida incubados con los espermatozoides humanos en medio TALP y medio IVF no fueron penetrados en ningún caso bajo las condiciones experimentales descritas y el núcleo del ovocito permaneció en todos los casos en estadio de Metafase II. Las muestras seminales incubadas con ionóforo de calcio durante 3 horas mostraron más del 70% de los espermatozoides con acrosoma reaccionado, mientras que las muestras incubadas sin ionóforo mostraron porcentajes de reacción acrosómica entre el 5 y 20%, lo que

demuestra que la inducción con el ionóforo de calcio produjo la exocitosis en un alto porcentaje de espermatozoides. Sin embargo en ninguna de las dos situaciones el espermatozoide fue capaz de penetrar el ovocito, a pesar de haber eliminado la ZP considerada hasta ahora como la única barrera que intervenía en la especificidad de especie. A pesar de ello, existen referencias que demuestran también la incapacidad de los espermatozoides humanos para penetrar ovocitos sin ZP de ratón y rata (10,11). Esto nos hace plantearnos que deben existir a nivel de la membrana plasmática mecanismos de reconocimiento del espermatozoide con cierta especificidad. Si bien el ovocito de hámster parece ser muy promiscuo y puede ser penetrado por espermatozoides de numerosos "filum" evolutivamente muy distantes, en otros casos como el humano Berford (12) planteó que evolutivamente habían sufrido cambios restrictivos en la superficie del espermatozoide que lo habían limitado y hecho más específico a la hora de unirse a las membranas. A la vista de los resultados el modelo de interacción espermatozoide humano-ovocito porcino sin ZP se muestra de interés para el estudio del bloqueo a nivel de membrana plasmática.

Experiencia II. Las cinco muestras seminales dieron como resultado tras la microinyección del espermatozoide humano en el ovocito porcino maduro la formación de pronúcleo masculino en porcentajes del 63, 80, 77, 93 y 87. También observamos activación de los ovocitos y formación de pronúcleo femenino en los siguiente porcentajes respectivamente 45, 70, 77, 85 y 75 %.

Otros autores (13) mediante ICSI heteróloga con ovocitos bovinos obtienen activación del ovocito del 83% y 60% de formación del aster espermático.

Este ensayo se demuestra válido para el estudio de los eventos post-ICSI, desintegración del acrosoma, descondensación del núcleo, formación de microtúbulos y migración del pronúcleo que son bastante desconocidos en el caso humano por las limitaciones del uso de ovocitos homólogos. También se presenta como un herramienta útil para el entrenamiento de nuevos técnicos que realicen ICSI o pruebas de testaje de nuevos medios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. (1976) Biol Reprod. Nov;15(4):471-6.
2. Rogers BJ. (1985) Fertl Steril. 1985 Jun;43(6):821-40.
3. Yanagimachi, R. (1984) Tokai J Exp Clin Med. Jun;9(2):81
4. Gadea J, Matás C, Lucas X. Anim Reprod Sci. 1998 Dec 31;54(2):95-108.
5. Gardon JC. Rev Iberoam Fértil. 18: 56-57. 2001
6. Funahashi H, Day BN. J Reprod Fertl. 1993 May;98(1):179-85.
7. Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C, E García. Reproduction. 2002 Aug;124(2):279-88.
8. Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. (1999) J Anim Sci. Dec;77(12):3346-52.
9. Liu DY, Baker HW. (1998) Hum Reprod. Apr;13(4):905-10.
10. Quinn P. J Exp Zool. (1979) Dec;210(3):497-505.
11. Pavlok A. (1980) Folia Biol (Praha).;26(3):188-93
12. Bedford JM. (1977) Anat Rec. Aug;188(4):477-87
13. Terada Y, Nakamura S, Morita J, Tachibana M, Morito Y, Ito K, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. (2004) Am J Reprod Immunol. Apr;51(4):290-3

Trabajo financiado por la Fundación Séneca PB/15/FS/02.