Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Eventos celulares durante la fecundación en humanos

Rawe, Vanesa Y.

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Rawe, Vanesa Y.. (2000). Eventos celulares durante la fecundación en humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3291_Rawe.pdf

Cita tipo Chicago:
Rawe, Vanesa Y.. "Eventos celulares durante la fecundación en humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3291_Rawe.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

EVENTOS CELULARES DURANTE LA FECUNDACION EN HUMANOS

Lic. Vanesa Y. Rawe
Director: Dr. Alfredo D. Vitullo

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción
CEGyR

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Año 2000

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
SCHOOL OF NATURAL SCIENCES

CELLULAR EVENTS DURING FERTILIZATION IN HUMANS

Author: VANESA RAWE
Director: Dr. ALFREDO VITULLO

Center of Studies in Ginecology and Reproduction
CEGyR
Private Institution affiliated to the University of Buenos Aires

Dissertion presented to obtain the Ph.D. degree in Biological Sciences

2000

№ 3

INDICE

Páginas

RESÚMEN 4
ABSTRACT 5
LISTA DE FIGURAS 6
LISTA DE TABLAS 7
INTRODUCCIÓN 9

I. CAPÍTULO I: INTERACCIÓN NORMAL ESPERMATOZOIDE-OOCITO 9

A. Requerimientos de la contribución espermática 9
1. Genoma haploide
2. Señal para la activación oocitaria
3. Centrosoma
4. Genoma mitocondrial
5. Estructuras accesorias espermáticas eliminadas durante la fecundación

B. Desmembramiento del espermatozoide 14

1. Pegado del espermatozoide- zona pelúcida, reacción acrosómica y penetración de la zona pelúcida
2. Pegado y fusión del espermatozoide al oolema
3. Transmisión de la señal de activación al citoplasma oocitario

C. Remoción de la teca perinuclear espermática 17

1. Morfogénesis de la teca perinuclear durante la espermatogénesis
2. Remoción de la teca perinuclear durante la fecundación y su posible papel en el pegado espermatozoide y oolema
3. Internalización de la teca perinuclear para la activación del oocito y otros factores presentes en la misma.

Páginas

II. CAPÍTULO II: EL CENTROSOMA, EL NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE Y EL PRONÚCLEO MASCULINO 20

A. La herencia del centrosoma, la aposición de los pronúcleos y la organización de microtúbulos 20

1. Reducción del centrosoma durante la gametogénesis
2. Reconstitución del centrosoma en la fecundación
3. Herencia materna del centrosoma en roedores y otras excepciones a la regla
4. Requerimientos para la actividad del centrosoma en el momento de la fecundación y desarrollo de pronúcleos
5. Factores que afectan el ensamblaje del centrosoma en el cigoto

B. Remodelado del núcleo espermático y desarrollo de pronúcleos 25

1. Reducción de puentes di sulfuro y desenmascaramiento del ADN espermático
2. Formación de la envoltura nuclear alrededor del pronúcleo en desarrollo
3. Eventos temporales de la formación de cigotos con dos pronúcleos
4. Desarrollo pronuclear y replicación del ADN

III. CAPÍTULO III: INTERACCIÓN A NORMAL ESPERMATOZOIDE-OOCITO 30

1. Cigotos con un pronúcleo
2. Cigotos con tres pronúcleos
3. Cigotos con cuatro o más subnúcleos

IV. CAPÍTULO IV: OTRAS POTENCIALES CONTRIBUCIONES PATERNAS 34

A. Eliminación de las mitocondrias paternas y estructuras accesorias de la cola del espermatozoide 34

1. Eliminación de las mitocondrias del espermatozoide durante la fecundación

2. Eliminación de las fibras densas externas y dobletes de microtúbulos en el citoplasma embrionario.

Páginas

OBJETIVOS 36

MATERIALES Y MÉTODOS 37

I. MATERIAL DE ESTUDIO: OBTENCIÓN Y CLASIFICACIÓN

II. PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

III. INMUNOCITOQUIMICA

IV. ANÁLISIS CROMOSÓMICO

APÉNDICE 55

RESULTADOS 57

I. CAPITULO I: FALLA DE FECUNDACIÓN 57

TABLAS 66

II. CAPITULO II: FECUNDACIÓN ANORMAL 78

TABLAS 82

DISCUSIÓN 86

AGRADECIMIENTOS 94

BIBLIOGRAFIA 97

RESÚMEN

Para dilucidar distintos aspectos del proceso de fecundación y desarrollo temprano, en la presente tesis se analizaron oocitos humanos 'no fecundados' y 'fecundados anormalmente' luego de Fecundación In Vitro (FIV) e Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI), haciendo hincapié en la arquitectura del citoesqueleto, estado de la cromatina, organización del áster y presencia de activaciones abortivas.

Se estudiaron un total de **815** oocitos clasificados como 'no fecundados' y **153** oocitos clasificados como 'fecundados anormalmente' luego FIV e ICSI. El material se procesó para inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de β tubulinas y α tubulinas acetiladas. El material genético se estudió con Hoechst 33258 y se analizó por microscopía óptica (UV). El análisis citogenético se realizó en **189** oocitos activados luego de FIV e ICSI según la técnica de Tarkowski (1966).

Durante las *fallas de fecundación*, la principal causa luego de FIV, fue la ausencia de penetración espermática (59,2%), el 10,5% mostró una falla de activación oocitaria y el 15,2% presentó alteraciones en la nucleación o migración de pronúcleos. Luego de ICSI, la principal causa de falla de fecundación fue la alteración de la activación oocitaria (36,5%). Un 18,5% de los oocitos detuvieron su desarrollo en la primera placa metafásica.

El estudio cromosómico, permitió identificar la presencia de activaciones abortivas; metafases III (MIII), núcleos reticulares (NR) y núcleos telofásicos (NT).

En la *fecundación anormal*, el patrón más frecuentemente detectado luego de FIV fue la presencia de 3 ó 4 pronúcleos (PNs), (77,4%). Por el contrario, luego de ICSI resultó ser la presencia de 1PN (65,2%). Se observaron leves diferencias en el desarrollo de subnúcleos entre ambos grupos.

Palabras claves: fecundación in vitro/ falla de fecundación/ fecundación anormal/ inyección intracitoplásmica de espermatozoides/ inmunofluorescencia.

ABSTRACT

In order to dilucidate different aspects during fertilzation and early development, we analyzed "non-fertilized" and "abnormally fertilized" human oocytes after In Vitro Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). We focused on the cytoskeletal architecture, chromatin configuration, aster organization and the presence of abortive activations.

We analyzed 815 "non-fertilized"and 153 "abnormally fertilized" oocytes after IVF and ICSI. The material was processed for immunofluorescence to detect β tubulins and α acetylated tubulins. DNA was studied using Hoescht. Chromosomal spreads were performed by Tarkowski's air-drying method in 189 IVF and ICSI oocytes.

During *fertilization failure*, the main reason after IVF was no sperm penetration (59.2%). The remaining oocytes showed different abnormal patterns: oocyte activation failure (10.5%) and defects in pronuclei apposition (15.2%). On the other hand, fertilization failure after ICSI was mainly associated to incomplete oocyte activation (36.5%). An 18.5% of the studied oocytes stopped their development at the metaphase of the first mitosis of the pre-embryo. The chromosomal spreads allowed identifying abortive activations, including metaphase III and others.

Immunofluorescence analysis of *abnormal fertilization* showed that the most frequent abnormal fertilization pattern found after IVF was the presence of 3 or 4 PNs (77.4%). On the other hand, the presence of 1 PN (65.2%) was the main pattern found after ICSI. No differences between both groups were seen in terms of subnuclei development.

Key words: In Vitro Fertilization/ Intracytoplasmic Sperm Injection/ Abnormal fertilization/ Fertilization failure/ Immunofluorescence.

LISTA DE FIGURAS Y ESQUEMA

Figura 1. Corte longitudinal del espermatozoide humano.

Figura 2. Representación esquemática de cortes transversales de la ultraestructura del flagelo espermático.

Figura 3. Detalle estructural del centrosoma de las células espermáticas.

Figura 4. Representación esquemática de los distintos estadios de activación abortiva.

Figura 5. Representación esquemática de los primeros eventos durante el desarrollo de pronúcleos.

Figura 6. Secuencia temporal de eventos durante la fecundación normal.

Figura 7. Oocito aparentemente no fecundado.

Figura 8. Distintos estadios madurativos de oocitos humanos.

Figura 9. Espermatozoides en cámara de Makler.

Figura 10. Gradiente de Percoll.

Figura 11. Secuencia de eventos durante una punción de epididimo.

Figura 12. Secuencia de eventos durante una biopsia de testículo.

Figura 13. Secuencia de eventos durante un ICSI.

Figura 14. Ausencia de penetración o inyección 'fallida' del espermatozoide.

Figura 15. Falla total de activación oocitaria en asociación con condensación prematura de cromosomas y falla de descondensación de la cromatina del espermatozoide.

Figura 16. Estadios de falla de fecundación luego de ICSI estudiados según la técnica de Tarkowski.

Figura 17. Oocito detenido durante el desarrollo de dos pronúcleos.

Figura 18. Oocito penetrado por dos espermatozoides.

Figura 19. Microscopía de contraste de fase de patrones de fecundación anormal luego de FIV e ICSI.

Figura 20. Microscopía de fluorescencia de oocitos fecundados anormalmente.

Esquema 1. Representación esquemática de los distintos estadios de falla de fecundación.

LISTA DE TABLAS

FALLA DE FECUNDACION

Tabla IA, B y C. Análisis por inmunofluorescencia de las fallas de fecundación en oocitos provenientes de FIV

Tabla IIA, B y C. Análisis por inmunofluorescencia de las fallas de fecundación en oocitos provenientes de ICSI

Tabla III. Fallas de fecundación en oocitos provenientes de FIV e ICSI. Valores totales

Tabla IVA y B. Análisis citogenético de oocitos que no mostraron pronúcleos con la expulsión de dos cuerpos polares luego de FIV

Tabla VA y B. Análisis citogenético de oocitos que no mostraron pronúcleos con la expulsión de dos cuerpos polares luego de ICSI

Tabla VI. Análisis Citogenético. Valores totales.

FECUNDACIÓN ANORMAL

Tabla VII. Totales de cigotos fecundados anormalmente luego de FIV e ICSI

Tabla VIII. Distribución de cigotos con 1PN luego de FIV e ICSI

Tabla IX. Distribución de cigotos multipronucleados luego de FIV e ICSI

Tabla X. Distribución de cigotos subnucleados luego de FIV e ICSI

EVENTOS CELULARES DURANTE LA FECUNDACIÓN EN HUMANOS

Lic. Vanesa Rawe

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación y Estudios Especializados (LABINEE)

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción

CEGyR

Institución privada afiliada a la Universidad de Buenos Aires

Viamonte 1438 (1055)

Buenos Aires, Argentina

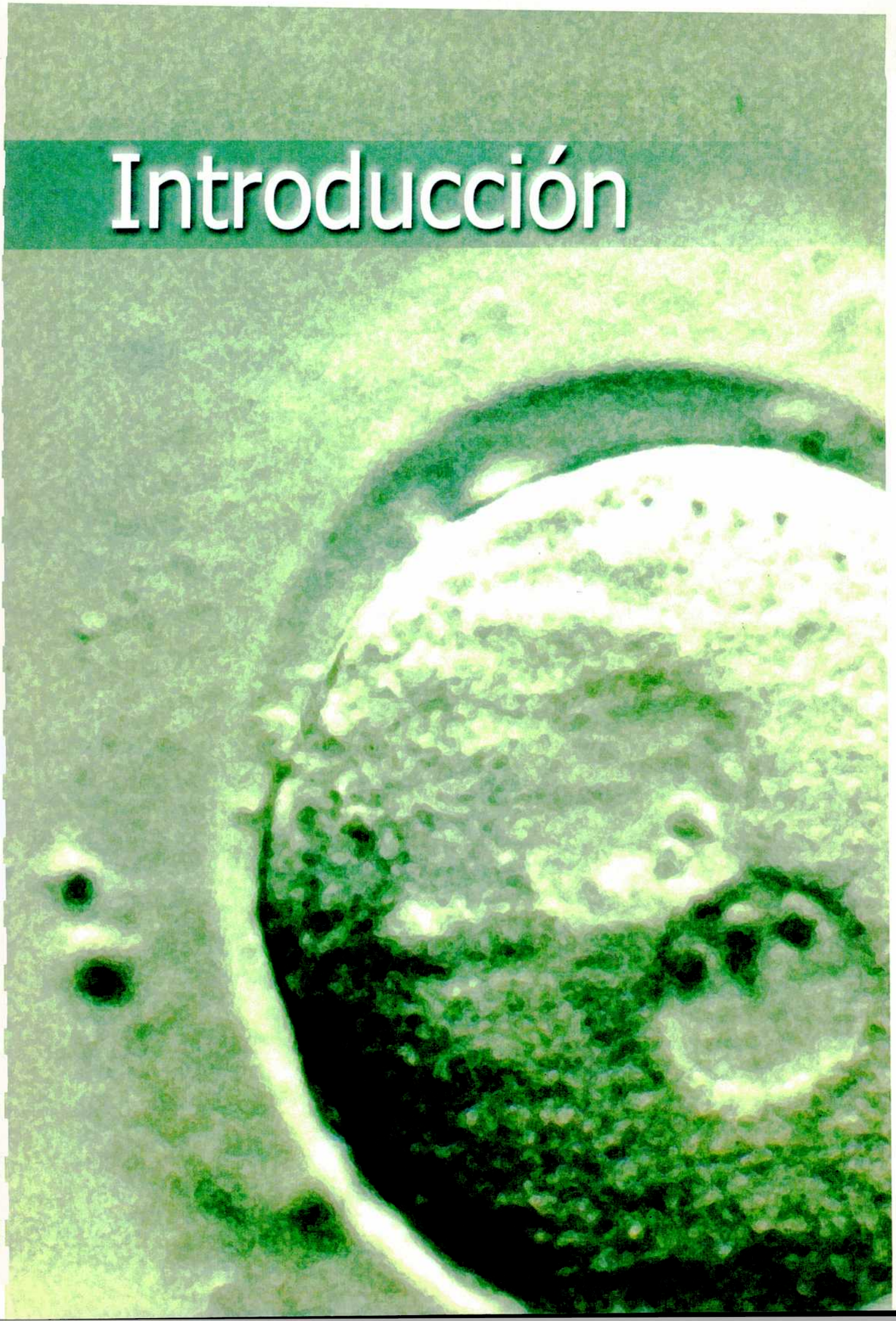
Teléfono: +54 114372-8289

Fax: +54 114371-7275

E-mail: vanerawe@hotmail.com

2000

Introducción



CAPITULO I

INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OOCITO

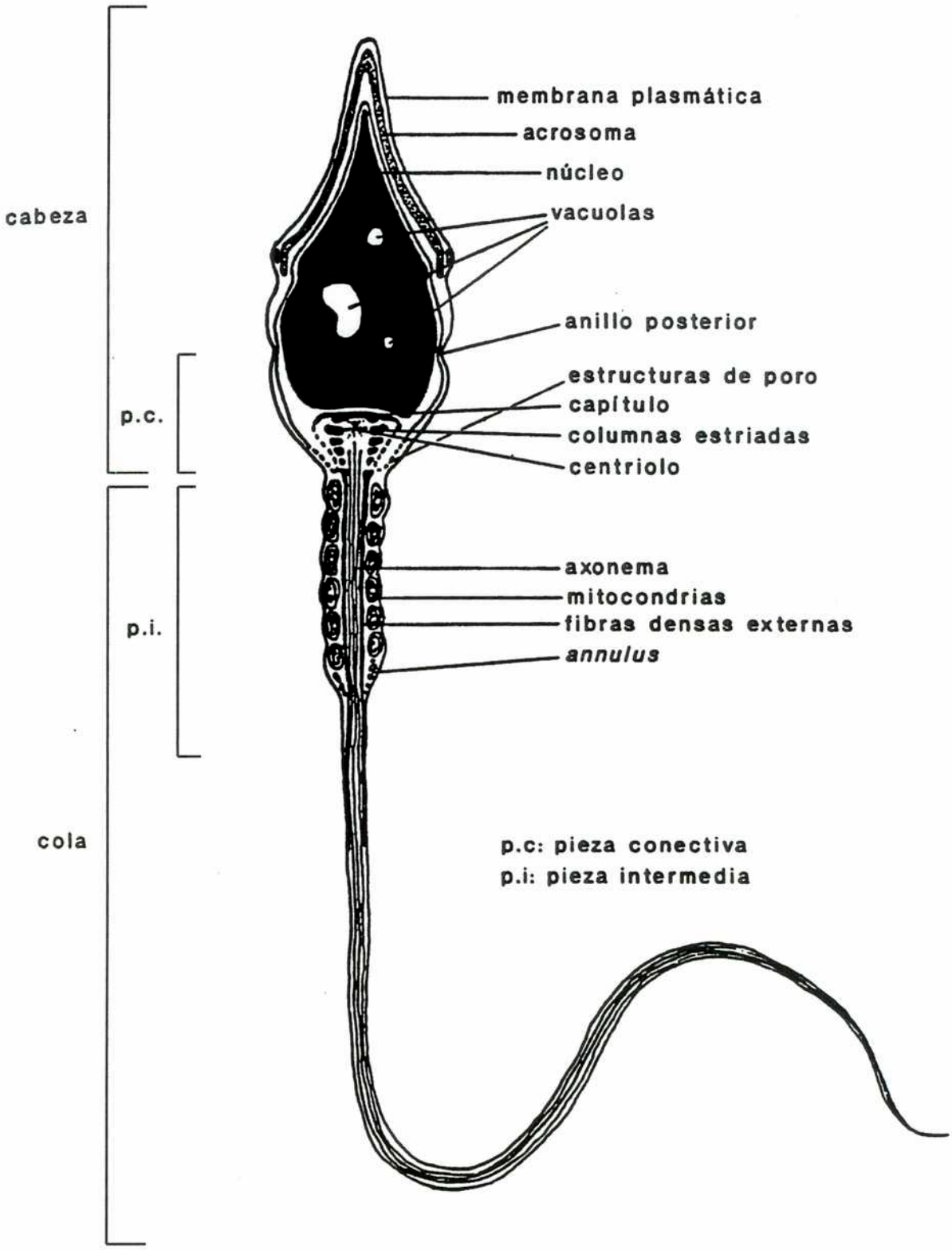
A. Requerimientos de la contribución espermática

1. Genoma haploide

La mayoría de los oocitos de mamíferos están detenidos en metafase de la segunda división meiótica antes de ser fecundados. La activación de un oocito quiescente por parte de un espermatozoide capaz de fecundar, resulta en la culminación de la segunda meiosis y la expulsión de la mitad de los cromosomas maternos en forma de segundo cuerpo polar (Schultz y Kopf, 1995), evento que se acompaña por un bloqueo de la poliespermia por exocitosis de los gránulos corticales. Al igual que la oogénesis, la espermatogénesis atraviesa dos divisiones meióticas que resultan en la haploidización del material genético paterno (Clemont, 1969, 1972). El paso final de la espermatogénesis, la espermiogénesis, genera estructuras del espermatozoide únicas designadas para asegurar la movilidad espermática y el transporte a través del tracto genital femenino y las cercanías al oocito (Figura 1 y 2). El núcleo del espermatozoide es deprivado de su esqueleto, las histonas son reemplazadas por proteínas testiculares de pegado al ADN, las protaminas, causando la hipercondensación de la cromatina del espermatozoide para formar finalmente un núcleo espermático hidrodinámico (Oko y Clemont, 1998). Las proteínas de los poros nucleares y las laminas nucleares pasan a ser obsoletas y son eliminadas durante el estadio de espermátide redonda. La envoltura nuclear se une con la cara interna de la teca perinuclear para formar una cápsula compacta alrededor del núcleo espermático (Courtens y col., 1976; Oko y Maravei, 1995). Es sabido que una vesícula lisosomal llamada acrosoma es derivada del complejo de Golgi (Bowen, 1922) y que su exocitosis facilita la penetración a través de las distintas membranas del oocito (Bedford, 1968; Beil y Wassarman, 1983). Las protaminas, otras proteínas del núcleo espermático y algunas estructuras accesorias sufren modificaciones postraduccionales asociadas con la maduración a través del epidídimo, la capacitación espermática y la interacción espermatozoide-oocito (Bedford, 1979; Colleau y col., 1997). Con esto, se puede afirmar que tanto el espermatozoide como el oocito están equipados con un grupo haploide de cromosomas cada uno y un arsenal de organelas complementarias y moléculas necesarias para asegurar una apropiada fecundación. En contraste con los cromosomas maternos que descondensan para formar el pronúcleo femenino luego de completada la segunda meiosis (Masui y Clarke, 1979) para participar en el desarrollo de pronúcleos y singamia, la cromatina paterna requiere un procesamiento adicional que involucra la reducción de los puentes di-

Figura 1. Corte longitudinal del espermatozoide humano.

El flagelo del espermatozoide humano tiene aproximadamente 50-60 μm de longitud y un diámetro de 1μm en el segmento próximo a la cabeza. Los principales componentes estructurales del flagelo son el axonema, la vaina mitocondrial, la vaina fibrosa y las fibras densas externas. La cabeza del espermatozoide se conecta a la cola a través de la pieza conectora o cuello. Las partes principales del cuello son el capítulo, el centríolo, las columnas estriadas, la placa basal y el anillo posterior. Detrás de la pieza conectora, está la pieza intermedia que contiene, bajo la membrana plasmática, mitocondrias dispuestas en forma de hélice envolviendo al axonema. *Adaptado por V. Rawe de Tesis Presentada por el Dr. Pedro Colom, Universidad de Valencia, 1995.*


membrana plasmática
acrosoma
núcleo
vacuolas
anillo posterior
estructuras de poro
capítulo
columnas estriadas
centriolo
axonema
mitocondrias
fibras densas externas
annulus
cabeza
p.c.
p.i.
cola
p.c: pieza conectiva
p.i: pieza intermedia

sulfuro y el reemplazo de las protaminas asociadas al ADN por histonas derivadas del oocito (Krzanowska, 1982; Kopecny y Pavlok, 1975; Perreault y col., 1984).

2. Señal para la activación oocitaria

El oocito de mamíferos maduro posee el ciclo celular detenido en metafase de la segunda división meiótica (MII) por acción del factor citostático (CSF, Masiu, 1982). Al mismo tiempo y por analogía con otras especies de mamíferos, el bloqueo se supone es mantenido por una actividad persistentemente alta del factor promotor de la mitosis (MPF). Desde un punto de vista funcional este factor es el mismo que el que controla la progresión del ciclo celular en las células somáticas, en las cuales su actividad cambia periódicamente para dirigir al núcleo celular hasta metafase durante cada división mitótica.

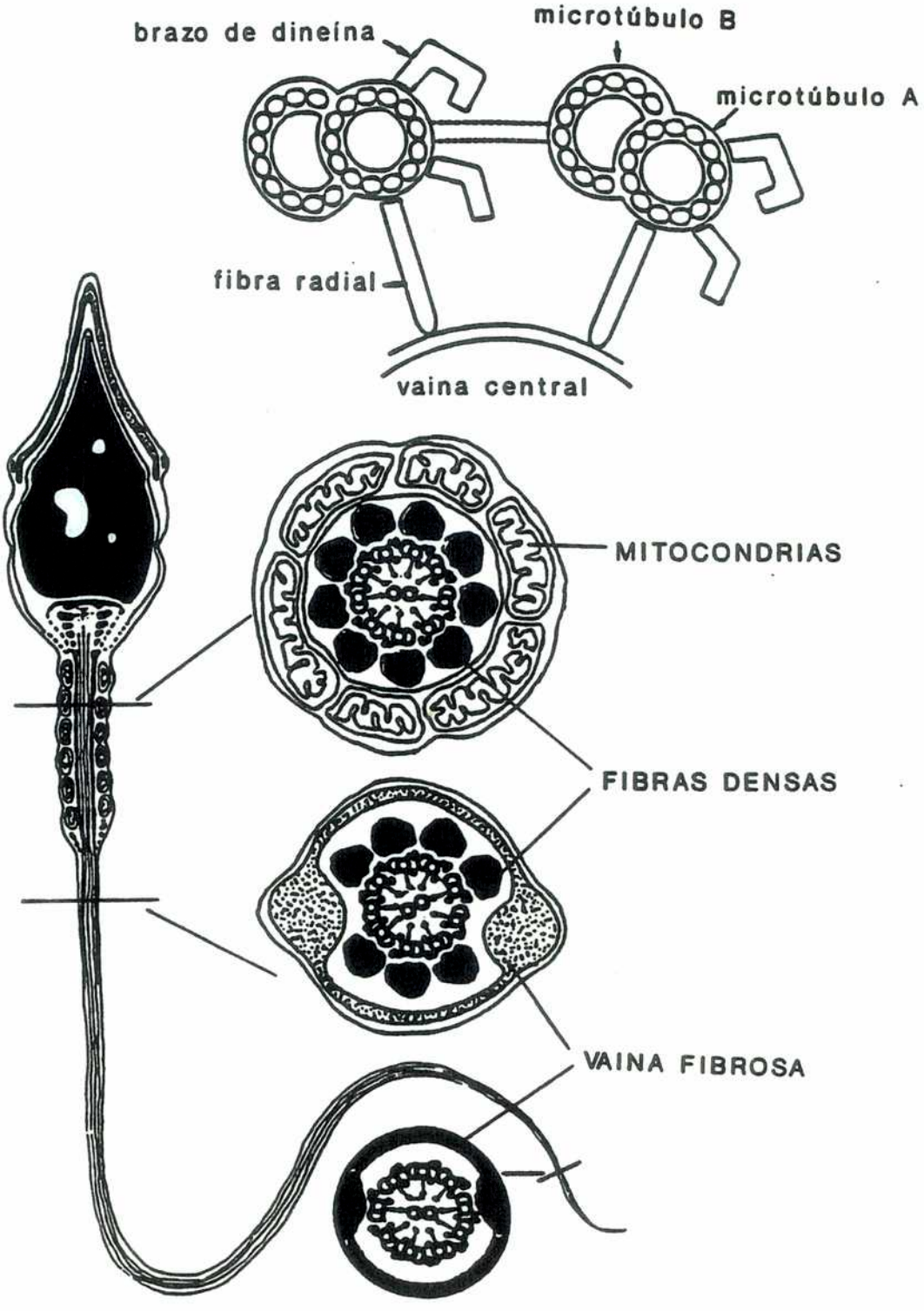
Se han formulado tres hipótesis para explicar el papel del espermatozoide durante la activación oocitaria. La teoría original fue formulada por Jaffe (1980), y considera que el espermatozoide per se es una fuente de Ca^{2+} para inducir activación. La segunda sugiere que la interacción ligando/receptor, a nivel de la membrana plasmática del oocito, gatilla una cascada de señalización que culmina con la activación del oocito (Jones y Whittingham, 1996). La tercera y más reciente hipótesis (Jones y col. 1998), sugiere que el espermatozoide capaz de fecundar, introduce un factor soluble directamente dentro del citoplasma del oocito. De una manera o la otra, está generalmente aceptado que la señal para la activación oocitaria es aportada por el espermatozoide (Swann, 1996). Algunos estudios sugieren que uno o más de esos factores estarían asociados a la teca perinuclear (Perinuclear Theca) (TP) del espermatozoide (Kimura y col., 1998), y serían transmitidos al citoplasma del oocito durante su disolución en el proceso de fecundación.

3. Centrosoma

El objetivo mayor del proceso de fecundación, es decir, la unión de los cromosomas paternos y maternos que darán lugar al genoma embrionario, se logra con la unión de los pronúcleos. Este proceso es dirigido por microtúbulos del oocito y depende de la capacidad de la cigota de reconstruir el centrosoma (Schatten, 1994) (Figura 3). Con algunas pocas excepciones, la movilidad citoplásmica de los microtúbulos de células en interfase, incluyendo células somáticas, oocitos y células espermáticas, es gobernada por un centrosoma activo compuesto por dos centriolos en forma de cilindros rodeados por un halo denso de material pericentriolar en los cuales reside la capacidad de reclutar microtúbulos. Estas estructuras denominadas centrosomas, se duplican durante la mitosis y la meiosis para dar lugar a los dos polos del

Figura 2. Representación esquemática de cortes transversales de la ultraestructura del flagelo espermático.

En el detalle se observa un corte de la pieza intermedia, pieza principal y pieza final. En las distintas porciones se pueden observar la disposición de las mitocondrias, el axonema, las fibras densas y la vaina fibrosa. En la parte superior de la figura se observa el detalle del complejo de microtúbulos que constituye el axonema. *Adaptado por V. Rawe de Tesis Presentada por el Dr. Pedro Colom, Universidad de Valencia, 1995.*


brazo de dineína
microtúbulo B
microtúbulo A
fibra radial
vaina central
MITOCONDRIAS
FIBRAS DENSAS
VAINA FIBROSA

huso meiótico o mitótico (Gould y Borisy, 1977; Kalnins y Rogers, 1992; Schatten, 1994) (Figura 3). El centrosoma de las células espermatogénicas está inicialmente involucrado en la generación del axonema del espermatozoide y es reducido más tarde a un único centríolo inactivo, o desmantelado en roedores (Woolley y Fawcett, 1973; Manandhar y col, 1998; Sutovsky y col., 1999). De manera contraria a la retención de un centríolo del espermatozoide que retiene su capacidad de duplicarse, los oocitos animales pierden ambos centríolos durante la oogénesis, pero acumulan un excesivo conjunto de material pericentriolar y proteínas del centrosoma (Szollosi y col., 1972; Palazzo y col., 1992). Durante la fecundación, el centríolo con el que contribuye el espermatozoide utiliza el conjunto de proteínas de material pericentriolar para su duplicación y conversión en el centrosoma del cigoto que será capaz de dirigir el desarrollo pronuclear y la formación del primer huso mitótico (Navara y col., 1994, 1996b; Sutovsky y col., 1996a,b). Por lo tanto, el desarrollo embrionario normal de los euterios superiores depende del aporte del centríolo espermático para la organización de un centrosoma y aparato mitótico activo.

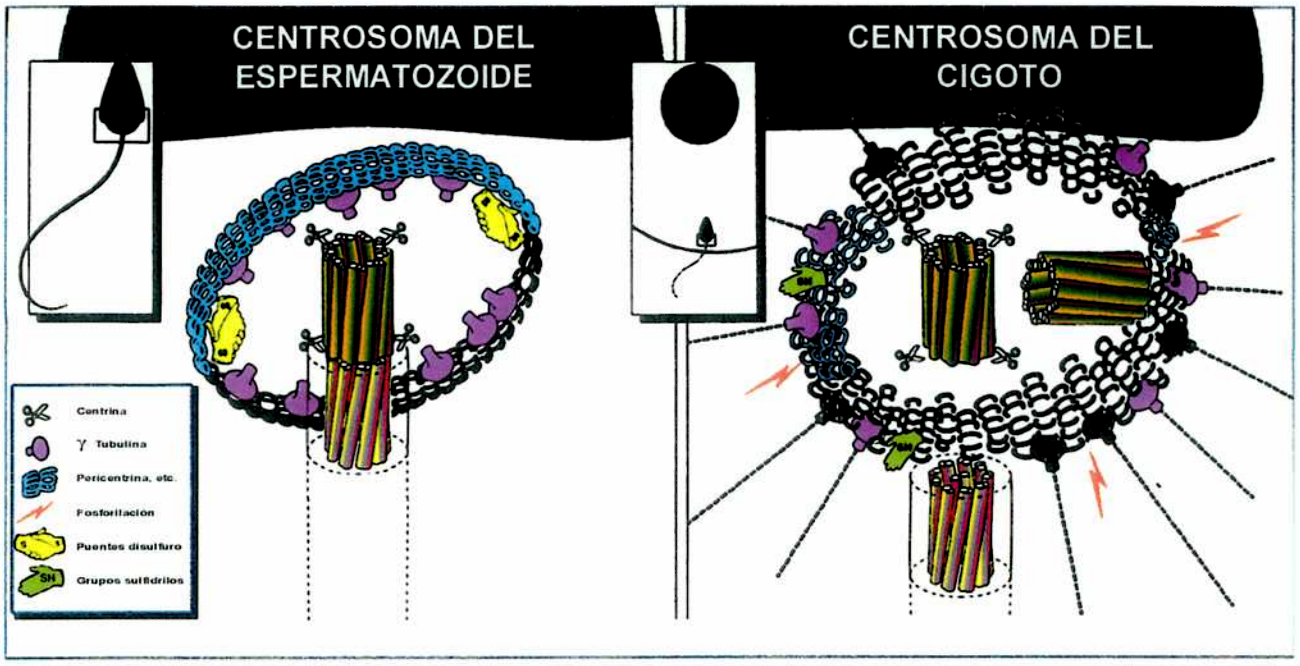
4. Genoma Mitocondrial

Además de la contribución del genoma haploide nuclear, tanto el espermatozoide como el oocito poseen genoma extranuclear representado por el ADN mitocondrial (ADN mit.). Mientras que el espermatozoide fecundante lleva el pool de ADN mit. paterno hacia el interior del oocito durante la fecundación, la herencia del ADN mit. sigue una línea estrictamente materna en mamíferos (Giles y col., 1980). La única posible explicación es que toda la contribución paterna mitocondrial sea destruida durante la fecundación. La coexistencia de dos genomas mitocondriales distintos en el mismo organismo causa una condición conocida como heteroplasmia que podría tener efectos adversos en el desarrollo embrionario (Zeviani y Antozzi, 1997). En mamíferos las mitocondrias paternas no contribuyen al pool de ADN mit. del cigoto, con lo que son eliminadas por algún mecanismo que recién se comienza a entender (Giles y col., 1980).

Además de la vaina mitocondrial, existen algunas otras estructuras accesorias del axonema del espermatozoide que son obsoletas luego de la incorporación en el citoplasma del oocito y que son también blanco de destrucción. Estas estructuras incluyen los dobletes de microtúbulos del axonema, las fibras densas exteriores, la columna estriada de la pieza conectora y la vaina fibrosa de la pieza principal (Figura 1 y 2). Se sabe poco del mecanismo de eliminación de esas estructuras aunque se cree que difiere del de destrucción del ADN mit. Es posible asegurar que la incorrecta eliminación de algunas de estas estructuras interfiera con el desarrollo normal desde momentos tan tempranos como la fecundación.

Figura 3. Detalle estructural del centrosoma de las células espermáticas y cigoto.

El centrosoma está inicialmente involucrado en la generación del axonema del espermatozoide y es reducido más tarde a un único centríolo inactivo. Durante la fecundación (derecha), el centríolo con el que contribuye el espermatozoide utiliza el conjunto de proteínas de material pericentriolar para su duplicación y conversión en el centrosoma del cigoto que será capaz de dirigir el desarrollo pronuclear y la formación del primer huso mitótico. El desarrollo embrionario normal de los euterios superiores depende del aporte del centríolo espermático para la organización de un centrosoma y aparato mitótico activo. *Adaptado por V. Rawe de ' The Centrosome and its Inheritance: The reduction of the Centrosome during Gametogenesis and Its Restoration during Fertilization'. Dev. Biol. 165, 299-335 (1994).*


CENTROSOMA DEL ESPERMATOZOIDE
CENTROSOMA DEL CIGOTO
Centrina
γ Tubulina
Pericentrina, etc.
Fosforilación
Puentes disulfuro
Grupos sulfidrilos

Eliminación de las mitocondrias paternas durante la fecundación

La vaina mitocondrial del espermatozoide de mamíferos es una hélice de 50 mitocondrias empaquetadas fuertemente que se ubican alrededor de la pieza media del espermatozoide. Con excepción del hámster Chino, tanto la cola del espermatozoide como la vaina mitocondrial intacta, entran al citoplasma del oocito durante la fecundación en mamíferos. Luego de la incorporación al oocito, esta vaina casi intacta permanece adherida a la cola del espermatozoide cercana que se mantiene cercana al pronúcleo masculino en desarrollo (Sutovsky y col., 1996a). Mientras el desarrollo de los pronúcleos avanza, las mitocondrias del espermatozoide se desintegran y se despegan eventualmente del axonema que se está desintegrando. Estas mitocondrias se rodean de cuerpos multivesiculares y lisosomas hasta desaparecer completamente en el estadio de cuatro células en bovinos (Sutovsky y col., 1996a). Existen evidencias de que las mitocondrias del espermatozoide son eliminadas por acción del citoplasma oocitario en estadios tempranos de la embriogénesis de mamíferos.
Cada mitocondria, incluyendo las de la cola del espermatozoide, llevan 10 copias completas del genoma mitocondrial que codifica para los componentes principales de la cadena respiratoria. Por otro lado, las proteínas y algunas enzimas mitocondriales son codificadas por genes nucleares que difieren sustancialmente de los mitocondriales. En breve, los genes mitocondriales poseen las siguientes características:

(i) Un mecanismo de reparación ineficiente, haciendo que ellos sean susceptibles a la mutagénesis
(ii) No se replican bajo el control del ciclo celular, lo cual explica la relativamente alta tasa de acumulación de mutaciones
(iii) Existen múltiples copias en una única célula
(iv) No poseen histonas ni proteínas asociadas
(v) Son heredadas de manera uniparental (materna) en mamíferos
(vi) No sufren recombinación homóloga

Estas propiedades justifican la alta tasa de mutagénesis observada en el ADN mit. y sugieren que la propagación de sólo el ADN materno sería una ventaja evolutiva. De hecho, la herencia uniparental del ADN mit. ocurre en la mayoría de los eucariontes, incluyendo plantas y protozoos (Birky, 1995).
La razón más probable para la eliminación de las mitocondrias del espermatozoide en mamíferos es la alta posibilidad de daño del ADN mit. durante la inseminación y fecundación. A pesar de la barrera de puentes di sulfuro que posee la vaina de mitocondrias, ésta

parecería no ser suficiente ante el ataque de sustancias oxigeno reactivas (ROS) generadas por espermatozoides aberrantes, leucocitos y células epiteliales. Como consecuencia de esta circunstancia y de un mecanismo de reparación ineficiente, el ADN mit. se encontraría altamente mutado. Además de los factores epigenéticos adversos, las enfermedades con origen mitocondrial parecen ser más prevalentes en varones que en mujeres. Usando PCR, Reynier y col., (1998) comprobaron una mayor tasa de mutaciones en el ADN mit. paterno (espermatozoides) comparada con la materna (oocito). Con esto, la destrucción del ADN mit. del espermatozoide luego de la fecundación, prevendría la propagación de ADN mit. paterno mutado y también la propagación de enfermedades relacionadas con las mitocondrias (Cummins, 1998).

La coexistencia de dos genomas mitocondriales en una misma célula es una condición conocida como heteroplasmia. Esta circunstancia ha sido relacionada con una amplia gama de desórdenes, la mayoría de los cuales afecta a tejidos que dependen de un fuerte papel mitocondrial (cadena respiratoria), como ser el tejido visual y auditorio, sistema nervioso, músculo, corazón, etc. Las mutaciones y deleciones en el ADN mit. se han relacionado con algunos desórdenes reproductivos que afectan la espermiogénesis, la motilidad espermática y la formación de la vaina mitocondrial (Kao y col., 1998, Lestienne y col., 1997).

3. Estructuras accesorias espermáticas eliminadas durante la fecundación

La pieza principal del espermatozoide está rodeada por una vaina denominada vaina fibrosa (Fibrous Sheath, FS), y la pieza media está rodeada por la gruesa vaina de mitocondrias (Figura 1 y 2). Durante la fecundación, las mitocondrias son removidas de la vaina mitocondrial, desenmascarando la pieza conectora que se separa del núcleo espermático y es desmantelada. Este evento lleva al centríolo espermático a ser expuesto al citoplasma del cigoto para transformarse en un centrosoma activo en el cigoto. De manera similar, la vaina fibrosa se disuelve en unas horas luego de la incorporación del espermatozoide en bovinos (Sutovsky y col., 1996). Tanto la fibra densa externa como la vaina mitocondrial persisten en el citoplasma embrionario hasta los primeros clivajes (Sutovsky y col., 1996b). Los dobletes de microtúbulos persisten en el citoplasma del oocito por varios ciclos celulares (Simerly y col., 1993). El desensamblaje de la vaina mitocondrial y la columna estriada es facilitado por el glutatión oocitario (Sutovsky y Schatten, 1997), y el desmantelamiento de la pieza conectora estaría mediado por fosforilaciones/ desfosforilaciones y por proteínas, como la centrina, que se une a Ca^{2+} (Figura 3). Los mecanismos de destrucción de la vaina fibrosa y las fibras densas externas no son del todo conocidos, pero se cree que el mecanismo no sería la ubicuitinación, como ha sido propuesto para las mitocondrias. Es posible que ciertas

kinasas y otras enzimas que se unen a estructuras del axonema del espermatozoide, contribuyan a este proceso (Carrera y col., 1994).

B. Desmembramiento del espermatozoide

1. Pegado a la zona pelúcida, reacción acrosómica y penetración a la zona pelúcida

El paso inicial de pegado de los espermatozoides a la zona pelúcida está mediado por glicoproteínas en ambas gametas (Benoff, 1997). Existe bastante acuerdo acerca del papel de ZP3 como receptor de la zona pelúcida e inductor de la reacción acrosómica para espermatozoides de ratón (Florman y Wassarman, 1985; Wassarman, 1990). Otras proteínas de la ZP sin embargo, facilitarían el pegado espermatozoide-oocito y determinarían la especificidad de esa interacción (Rankin y col., 1998). Por parte del espermatozoide, existen varios candidatos que cumplirían el papel de ligandos que se asocian a ZP3 o a otras proteínas de la ZP. Entre otros, ellos incluyen: la proacrosina /acrosina (Jones, 1991; Urch y Patel, 1991), tirosinas kinasas estimuladas por ZP3 (Burks y col., 1995), proteínas de membranas plasmáticas con actividad hialuronidasa, PH-20 (Primakoff y col., 1985), la proteína SP-10 involucrada en el pegado secundario a la ZP (Coonrod y col., 1996; Freemarman y col., 1994), una proteína G acoplada a β-1,4- galactosiltransferasa (Gong y col., 1995), una fosfolipasa A2 (Riffo y Parraga, 1997). El pegado de ZP3 a receptores de la membrana plasmática del espermatozoide, gatilla una serie de señales y eventos estructurales que resultan en la vesiculización de la membrana acrosomal externa (Bedford, 1968; Bleil y Wassarman, 1983), dispersión del contenido acrosomal y pegado secundario de la membrana acrosomal interna a la ZP (Yanagimachi, 1994). Está en disputa todavía, si las hidrolasas acrosomales (Barros y col., 1996) asisten a la penetración de la zona o facilitan sólo el pegado inicial a ella (Bedford, 1998). Es posible que la matriz acrosomal sea un rudimento evolutivo y que la exocitosis acrosomal simplemente permita el pegado secundario a la zona de los espermatozoides reaccionados vía proteínas ancladas a la membrana acrosomal interna tal como la PH-20 (Myles y Primakoff, 1997). Estas y otras proteínas acrosomales podrían ser útiles también durante la penetración del cúmulus oofurus antes del pegado a la ZP. La reacción acrosomal remueve la membrana externa acrosomal y la matriz acrosomal, mientras que la membrana acrosomal interna, la teca perinuclear acrosomal y la envoltura nuclear (llamadas en su conjunto perforatorium), pueden ser vistas dentro del espacio perivitelino y, al menos en ratas (Fawcett, 1975), entran al oocito en donde pueden persistir hasta los primeros clivajes embrionarios (Szollosi, 1976). La persistencia del acrosoma y/o el perforatorium luego de fecundación asistida, podría afectar los resultados de

los tratamientos tales como la inyección intracitoplásmica de espermatozoides y la inyección de espermátides redondas o elongadas.

2. Pegado y Fusión del espermatozoide con el oolema

Una serie de antígenos han estado involucrados en el proceso de pegado del espermatozoide con el oolema. Estos incluyen la proteína epididimaria DE (Cohen y col. , 1996; Rochweger y col., 1992), ecuatorina (Toshimori y col., 1998), vitronectina (Fusi y col., 1996) y los antígenos espermáticos que reaccionan de manera cruzada con los anticuerpos que bloquean la fecundación como ser el MH61 (Okabe y col., 1990), M29 y M37 (Saling y col., 1985) y OBF 13 (Okabe y col., 1988). La mayoría de esos estudios se basaron en experimentos con anticuerpos bloqueantes de la fecundación dirigidos contra antígenos de superficie espermáticos. A pesar de ser útiles, dichos estudios frecuentemente no proveen suficiente información sobre los receptores de oolema complementarios a dichos antígenos espermáticos o sobre su función en la fusión del espermatozoide y oolema luego del pegado inicial. Inicialmente, Bronson y Fusi (1990) demostraron la presencia de las integrinas en el oolema de los oocitos humanos y su participación en el pegado del oolema a un receptor específico del espermatozoide. En cobayos se identificó uno de esos receptores con dominio de fusión a membrana denominado fertilina o PH-30 (Blobel y col., 1992; Wolfsberg y col., 1993). Los análogos de fertilina fueron encontrados más tarde en ratón (Cho y col., 1997), rata (McLaughlin y col., 1997), monos *Cynomolgus* (Ramarao y col., 1996), monos *Rhesus* (Perry y col., 1995), humanos (Gupta y col., 1996), conejos (Hardy y col., 1966) y bovinos (Waters y White,1997). En 1995 fue descubierta una familia entera de metaloproteasas relacionadas con la fertilina con un dominio de fusión viral (ADAMs)(Wolfsberg y col., 1995). A pesar que existe consenso acerca del papel de la fertilina β y la integrina $\alpha 6$ $\beta 1$ en el pegado de espermatozoide-oocito (Almeida y col., 1995), la evidencia de su participación en la fusión espermatozoide-oocito es incompleta, no obstante la existencia del dominio de fusión viral en la molécula de fertilina. El knock-out del gen de la fertilina β en ratón reduce pero no elimina completamente la capacidad del espermatozoide mutante de pegar y de fusionarse con los oocitos in vitro (Cho y col., 1998). Otras proteínas tipo ADAMs están involucradas en el pegado y/o fusión del espermatozoide-oocito (Cho y col., 1996;Yuan y col., 1997). Del lado del oocito, la función de la integrina $\beta 1$ parece estar compensada con otras moléculas de adhesión (integrinas y péptidos que contengan RGD) durante la fusión de gametas en humanos (Ji y col., 1998). Estos datos sugieren que el pegado y fusión del espermatozoide-oocito, a pesar de estar facilitado por la interacción fertilina-integrina, no depende exclusivamente de ésta.

El destino de la membrana plasmática del espermatozoide luego de la fecundación es desconocido. A pesar que algunos investigadores sugieren que la membrana plasmática permanece como "parches" sobre la superficie de los oocitos fecundados de ratón y erizo de mar (Gabel y col., 1979), es más probable que ocurra incorporación de la membrana plasmática espermática durante la fecundación (Gundersen y col., 1986). La fluidez del oolema podría causar la dispersión de los componentes de membrana del espermatozoide, en cambio, la incorporación de la membrana del espermatozoide sería responsable del bloqueo de la poliespermia oolema-específico, como fue demostrado (Krukowska y col., 1998). Otra pregunta que merece ser investigada es la regionalidad del pegado espermatozoide-oocito. Yanagimachi (1994) sugirió que el sitio de pegado primario de las microvellosidades del oocito sobre el núcleo del espermatozoide, al menos en ratones, es la porción ecuatorial. En oposición, varias de las proteínas involucradas en el pegado espermatozoide-oocito están distribuídas por toda la cabeza del espermatozoide. En bovinos, se observó el pegado de las microvellosidades del oocito sobre la porción ecuatorial, así como también sobre el perforatorium y la vaina postacrosomal de la cabeza del espermatozoide (Sutovsky y col. , 1996b; Sutovsky y col., 1997a,b).

3. Transmisión de la señal de activación dentro del citoplasma oocitario

Al contrario de lo que ocurre en peces, equinodermos y ranas, en los cuales el espermatozoide induce un único incremento monotónico en la concentración de Ca^{2+} intracitoplasmático ($[Ca^{2+}]_i$), la señal de activación en mamíferos consiste en una serie de picos de $[Ca^{2+}]_i$ conocido como oscilaciones. En oocitos humanos el espermatozoide induce oscilaciones que pueden durar de 5-6 hs (Sousa, 1996), la frecuencia de aparición varía entre 2- 35 minutos, hecho que es altamente variable de oocito en oocito, pero relativamente estable dentro de un mismo oocito (Sousa, 1996). Existe una reacción temprana de $[Ca^{2+}]_i$, que en el oocito humano se caracteriza por un grupo inicial de 3-6 picos rápidos, que son después seguidos por picos de menor frecuencia para el resto del período de oscilaciones. Se cree que las oscilaciones de Ca^{2+} en oocitos de mamíferos comparten un código de frecuencias que debe completarse para una correcta activación (Miyazaki y col., 1993).

En vista de la larga duración de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por el espermatozoide en los oocitos humanos, está claro que la gameta masculina no sólo debe poseer la *llave* para iniciar las oscilaciones (ser el gatillador), sino también el mensaje necesario para modificar las propiedades de uno o varios elementos involucrados en la regulación de la homeostasis del $[Ca^{2+}]_i$ (canales y reservorios de Ca^{2+} intracelulares), propiedad por la que se denomina *oscilador* (Swann y col., 1990).

El factor citosólico espermático descripto por Parrington (1996), denominado *oscilina*, es el candidato para la función de oscilador. Los datos experimentales obtenidos con oocitos humanos, sugieren que las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ son mantenidas por liberación y reabsorción periódica de Ca^{2+} desde los reservorios inositol trifosfato (IP3) sensibles, ubicados predominantemente en la corteza y subcorteza y desde los reservorios rianodina sensibles localizados en el centro del ooplasma (Tesarik y Sousa, 1996). De acuerdo a este modelo la capacidad del oocito de mantener las oscilaciones de Ca^{2+} depende de la sensibilidad diferencial a un fenómeno denominado liberación de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por Ca^{2+} (calcium induction calcium release, CICR) de dos tipos de reservorios de $Ca^{2+}{}_i$: una liberación inicial desde los reservorios IP3 sensibles actuaría como *detonador* para la CICR desde los reservorios centrales rianodina sensibles, desde donde se originarían la mayoría de las liberaciones de Ca^{2+}.

En el ratón la activación de los oocitos luego del tratamiento con etanol o luego de FIV, a veces resulta en la expulsión de un segundo corpúsculo polar sin la formación de pronúcleo/s. El set haploide de cromosomas con una sola cromátide remanente permanece condensado y alineado en una nueva placa metafásica denominada metafase III (MIII) (Kubiak, 1989). Cualquier desarreglo en la amplitud y/o frecuencia de los pulsos de Ca^{2+} intracelulares, inactiva de manera incompleta al MPF (factor promotor de la mitosis e inductor universal de la fase M), y generan en el oocito una activación abortiva (MIII u otras), con la formación de una tercera placa metafásica y la imposibilidad de salir de metafase y progresar hacia interfase, a menos que el oocito reciba un nuevo estímulo activador (Vitullo y Ozil, 1992) (Figura 4).

Otra situación similar se denomina en el ratón S 40; en este caso el segundo corpúsculo polar expulsado no posee material genético o no es expulsado (Figura 4), y en el citoplasma permanecen condensados 40 cromosomas con una sola cromátide (Kubiak, 1989).

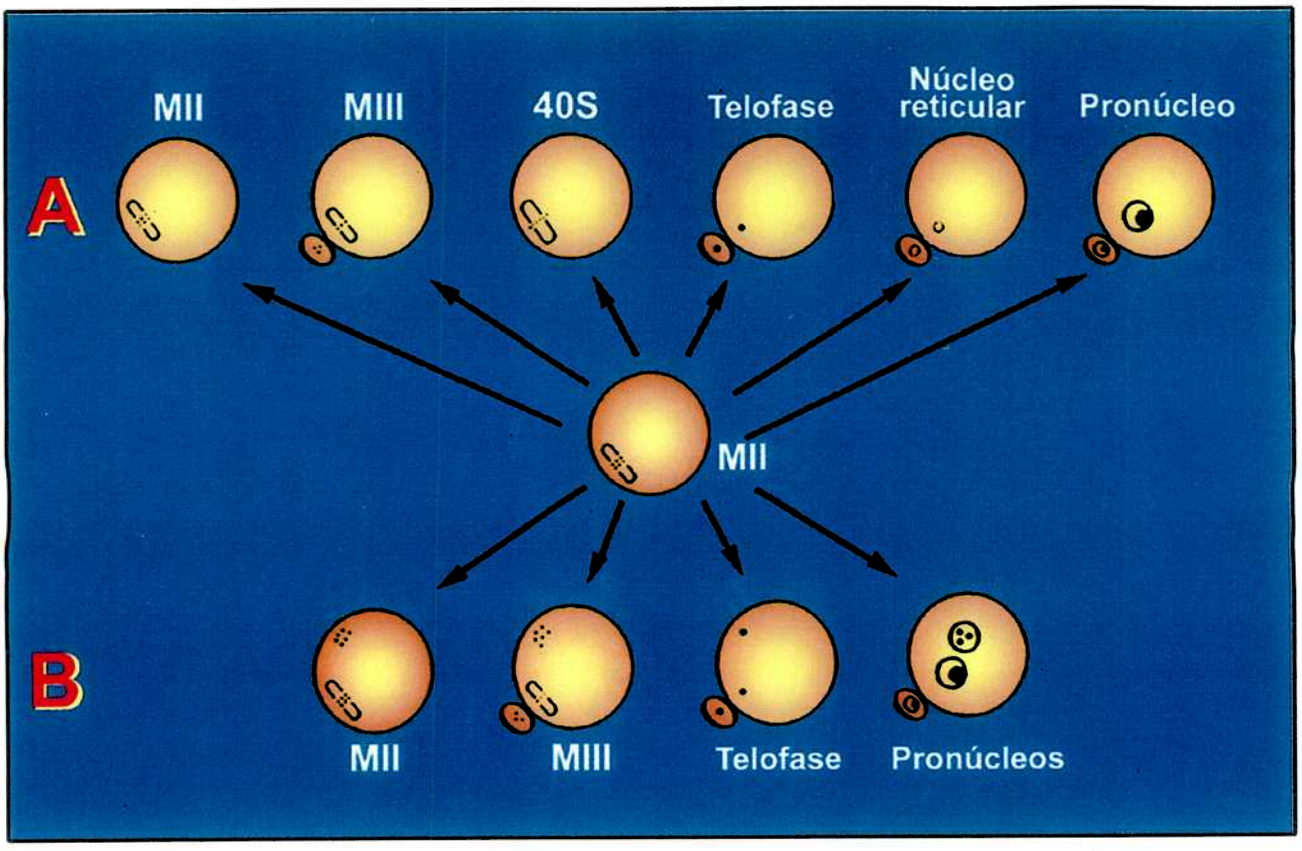
C. Remoción de la teca perinuclear del espermatozoide

1. Morfogénesis de la teca perinuclear durante la espermatogénesis

La teca perinuclear, también llamada sustancia o matriz perinuclear (Bellvé y col., 1992; Courtens y col., 1976; Lalli y Clermonnt, 1981; Oko y Clermont, 1988) es una cubierta del citoesqueleto que recubre el núcleo del espermatozoide, y que está compuesta por proteínas tipo citokeratina y mielina. Esta matriz se encuentra inserta entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear del espermatozoide con quien parece estar íntimamente asociada (Oko y Maraveri, 1995). Las proteínas de la TP primero aparecen en la superficie apical nuclear en las espermátides redondas (Oko, 1995; Oko y Maraveri, 1995). Usando la clasificación de

Figura 4. Representación esquemática de los distintos estadios de activación abortiva.

A: Los oocitos en MII pueden reaccionar de seis maneras diferentes frente al estímulo activador con etanol (Kubiak, 1989). (i) Los oocitos quedan detenidos en MII, (ii) puede ocurrir la expulsión del segundo cuerpo polar pero en vez de pasar a interfase pasan a una placa metafásica denominada MIII: con los cromosomas con una sola cromátide condensados en la placa metafásica y en el segundo cuerpo polar (CP), (iii) estadio de 40 cromátides (40S): con los cromosomas con una sola cromátide dentro del citoplasma y el CP sin material genético (2hs luego del tratamiento se desprende fácilmente), (iv) el núcleo puede permanecer en telofase con un grupo de cromatina muy teñida en el citoplasma y en el CP, (v) puede ocurrir la formación de un núcleo pequeño, redondo y con cromatina en forma reticular (núcleo reticular) y por último (vi) puede originarse el estadio de pronúcleo. B: Durante la fecundación in vitro, Kubiak (1989) observó las mismas respuestas que con el estímulo partenogenético pero no se vio la respuesta 40S ni la de núcleo reticular. *Adaptado por V. Rawe de Kubiak.* ´ Mouse oocytes gradually developed the capacity for activation during the metaphase II arrest' . *Dev. Biol.*, 136: 537-545, 1989.


A
MII
MIII
40S
Telofase
Núcleo reticular
Pronúcleo
MII
B
MII
MIII
Telofase
Pronúcleos

espermatogénesis de Berndston y Desjardins (1974) y Barth y Oko (1989), Oko y Maravei (1995) presentaron una detallada descripción de la biogénesis de la TP en toros. Inicialmente, las proteínas de la TP se acumulan en la superficie del gránulo acrosomal derivado de Golgi, el cual no está adherido a la superficie nuclear en los estadios 1 y 2 de espermátides redondas. En el estadio 4 de las espermátides redondas, la formación del capuchón acrosomal ocurre en paralelo con el pegado del gránulo acrosómico a la envoltura nuclear y al complejo de proteínas que conformarán la TP sobre la superficie apical, resultando en la formación de una capa continua de TP subacrosomal. Mientras el núcleo de la espermátide se condensa y se elonga, la TP sufre el mismo cambio. Además de cubrir la superficie subacrosomal separando el acrosoma de la envoltura nuclear, la TP cubre la porción ecuatorial del acrosoma en el estadio 8 de espermátide redonda. En un espermatozoide completamente diferenciado, la vaina postacrosómica de TP se extiende hasta la fosa de implantación en la superficie nuclear posterior y de esa manera el acrosoma queda comprendido entre la capa subacrosómica y la capa periacrosómica externa de TP, cubriendo de esa manera el núcleo espermático por completo.
Una correcta biogénesis de la TP es un prerequisito para que el núcleo del espermatozoide posea una forma normal, ya que la falta de TP coincide con la forma nuclear aberrante denominada globozoospermia (Escalier, 1990).

2. Remoción de la Teca Perinuclear en la fecundación y su posible papel durante el pegado espermatozoide-oolema

Además de los datos sobre la necesidad de una correcta biogénesis de la TP para una normal espermatogénesis, la TP compacta y anormal sería una barrera para una normal fecundación, evitando el remodelado del núcleo espermático para pasar a ser pronúcleo masculino. El núcleo del espermatozoide se transforma en pronúcleo masculino con la liberación de las protaminas espermáticas seguido de una captación de histonas y otras moléculas del citoplasma oocitario (Ecklund y Levine, 1975; Kopecny y Pavlok, 1975; Perrault y col., 1984). Este evento sería imposible sin la eliminación de la TP del espermatozoide (Sutovsky y col., 1997a), y sin la formación de novo de la envoltura nuclear (EN) con complejos de poros nucleares funcionales (Sutovsky y col., 1998 b). Algunos datos en ratón (Usui, 1996) y bovinos (Sutovsky y col., 1997a) sugieren que la TP es removida de la superficie del núcleo espermático en un estadio inicial de incorporación y que la cromatina espermática entra al oocito completamente "desnuda" de toda sus membranas, incluyendo su envoltura nuclear intrínseca (Sutovsky y col., 1998 b; Usui y Yanagimachi, 1976; Usui y col., 1997).

En rata se disocia el perforatorium entero del núcleo del espermatozoide dentro del citoplasma oocitario (Szollosi, 1976). En bovinos, las microvellosidades del oocito se pegan a la TP del espermatozoide luego de la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide y el oolema quedando intercaladas entre vainas individuales de TP. Posteriormente, la TP es removida y el núcleo espermático se expone al citoplasma del oocito. La persistencia de la TP sobre la superficie de espermatozoide de toros intactos inyectados dentro del citoplasma de oocitos bovinos maduros, causa la falla de desarrollo pronuclear (Sutovsky y col., 1997). De manera similar, algunos estudios reportaron en humanos (Bourgain y col., 1998) y en monos (Hewiston y col., 1996), la presencia de un desarrollo pronuclear aberrante asociado con la persistencia de acrosoma y/o TP subacrosomal. Con esto se sugiere que la remoción de la TP del espermatozoide es un prerrequisito para el desarrollo pronuclear normal en mamíferos.

3. Internalización de la Teca Perinuclear para la activación oocitaria

El papel de la TP durante la fecundación normal podría no estar restringido a la simple remoción de esta barrera. Algunas evidencias sugieren que algunos factores con capacidad de activación sean liberados desde la TP y se disuelvan en el citoplasma del oocito. Estos serían los responsables de la iniciación de las oscilaciones de Ca^{2+} luego de la fecundación. La inyección intracitoplásmica de espermatozoide de pacientes que sufren globozoospermia, una patología asociada a la ausencia de TP (Bacetti y col., 1997; Escalier, 1990), está asociada a una falla de activación de oocitos maduros y a una consecuente falta de inducción de picos oscilatorios de Ca^{2+} (Battaglia y col., 1997; Rybouchkin y col., 1996). Por otro lado, se demostró que la inyección intracitoplásmica de extractos crudos de TP pueden inducir activación oocitaria (Kimura y col., 1998). El mayor candidato para jugar el papel de proteína oscilogénica espermática es la oscilina o la glucosamina-6-fosfatodeaminasa (Parrington y col., 1996). Esta proteína fue encontrada en la región del segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide que está envuelta por la TP. A pesar que no se encuentran remanentes de TP en el espacio perivitelino de oocitos fecundados y sobre la superficie del núcleo espermático dentro del citoplasma del oocito (Sutovsky y col., 1996b; Sutovsky y Schatten, 1999), se pueden detectar fragmentos de TP en el citoplasma oocitario cerca del pronúcleo masculino en un estadio temprano del desarrollo pronuclear. De manera similar, no se han observado en el pronúcleo masculino dentro de oocitos de monos *Rhesus* fecundados in vitro. Es muy probable que factores con capacidad oscilogénica se liberen desde la TP y se disuelvan en el citoplasma oocitario. Otros factores de importancia para el éxito de la fecundación, como factores de transcripción (Herrada y Wolgemuth, 1997), podrían estar asociados también a la TP.

CAPITULO II

EL CENTROSOMA, EL NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE Y LOS PRONÚCLEOS

A. La herencia del centrosoma, la aposición de los pronúcleos y la organización de microtúbulos

1. Reducción del centrosoma durante la gametogénesis

El centrosoma funcional está compuesto por dos centríolos, estructuras en forma de cilindros que contienen nueve tripletes de microtubulos, y material pericentriolar alrededor de ellos (Kalnins y Rogers, 1992; Schatten, 1994; Vorobjev y Chentsov, 1982) (Figura 3). A pesar que los centríolos pueden proveer la estabilidad estructural y servir para el ensamblaje y duplicación de un centrosoma activo, es el material pericentriolar el que posee la actividad nucleadora de microtúbulos (Gould y Borisy, 1977). La polimerización de tubulinas comienza desde la estructura en forma de anillo que contiene una única clase de tubulina: γ tubulina (Joshi, 1993; Moritz y col., 1995). Otras proteínas centrosomales de diferentes organismos son la centrina (Sanders y Salisbury, 1989), la centrosomina (Joswig y col., 1991), la katamina (Mc Nally y col., 1996), el complejo MPM-2 (Westendorf y col., 1994), la nineina (Bouckson-Castaign y col., 1996) y la paracentrina (Doxey y col., 1994). En oposición al modelo general de centrosoma, los oocitos de mamíferos pierden los centríolos durante la oogenesis y sus polos meióticos están ocupados por centros organizadores de microtúbulos acentriolares (Hertig y Adams, 1967; Sathananthan y col., 1991, 1996). De un modo complementario, el centrosoma de los espermatozoides de mamíferos es reducido a un simple centríolo o es eliminado completamente durante la espermiogénesis (Sutovsky y col., 1999). Todavía en la base de la cola de espermátides redondas de mamíferos se pueden visualizar dos centríolos (Fouquet y col., 1998; Manandhar y col., 1998). El centríolo proximal esta pegado al plato basal del axonema del espermatozoide en la fosa de implantación, que a su debido tiempo sirve para la asociación del axonema al núcleo. El centríolo distal está orientado de manera perpendicular al proximal y parece servir como molde del ensamblaje de los dobletes de microtúbulos del axonema. En la mayoría de los mamíferos euterios y en marsupiales, el centríolo proximal queda retenido durante la espermiogénesis y espermiación. En un espermatozoide maduro, el centríolo proximal esta cubierto por una densa masa de capitolium que probablemente reemplace al activo material pericentriolar pero que es inerte a la nucleación de microtubulos. El centríolo distal se desmantela durante la elongación espermática y en un espermatozoide totalmente maduro desaparece por completo (Manandhar y col., 1998). En los roedores, representados por el ratón (Manandhar y col., 1998), hámster (Fouquet y col., 1998), cobayo (Fouquet y col., 1998) y rata (Wooley y

Fawcett, 1973) ambos centríolos desaparecen durante la espermiogénesis. En ratón, Manandhar y col., 1998 dividieron la desaparición del centrosoma espermático y los dos centríolos en tres diferentes pasos:

(i) pérdida de la capacidad de nucleación
(ii) pérdida de proteínas centrosomales como γ tubulina y centrina
(iii) desintegración de ambos centríolos

Por lo tanto, la reducción del centrosoma durante la gametogénesis masculina y femenina ocurre de manera desigual y complementaria. Mientras que los oocitos pierden ambos centríolos y retienen la actividad del material pericentriolar, en los espermatozoides sólo uno de los centríolos se pierde. El centrosoma espermático reducido no posee material pericentriolar con actividad para reclutar microtúbulos (nucleación). Como excepción a esa regla, los roedores están deprivados de los dos centríolos, y de esta manera el centrosoma completo es aportado por el oocito.

2. Reconstitución del centrosoma durante la fecundación

En contraposición de la igualitaria contribución genómica de ambos padres, la herencia citoplásmica en mamíferos varía sustancialmente para organelas individuales. En 1901, T. Boveri formuló la teoría de la herencia del centrosoma y más tarde se hallaron evidencias que la apoyaban como ser la ausencia de centríolos en los oocitos de ratón (Szollosi y col., 1972), conejo (Zamboni y Mastroianni, 1966), bovinos (Sathananthan y col., 1997b) y humanos (Hertig y Adam, 1967), y la presencia de un centríolo proximal distal intacto en los espermatozoides de la mayoría de las especies animales. La reconstitución del centrosoma del cigoto ha sido descripta en detalle por estudios ultraestructurales e inmunocitoquímicos en bovinos (Long y col., 1993; Navara y col., 1994, 1996a; Sutovsky y col., 1996b; Sutovsky y Schatten, 1997), humanos (Asch y col., 1995; Sathananthan y col., 1991, 1996; Simerly y col., 1995), chanchos (Kim y col., 1996; Szollosi y Hunter, 1973), conejo (Longo, 1976; Pinto-Correa y col., 1994), monos *Rhesus* (Hewitson y col., 1996; Sutovsky y col.,1996a; Wu y col., 1996) y cabra (Crozet, 1990).

El ensamblaje de un centrosoma activo ha sido estudiado en detalle en bovinos y monos *Rhesus* (Sutovsky y col., 1996b). En el primer paso, la compleja estructura de la pieza conectora del espermatozoide en la cual está inserta el centríolo espermático, debe ser desarmada para liberar al centríolo proximal dentro del citoplasma oocitario. Inicialmente las mitocondrias de la vaina mitocondrial son removidas de la superficie de la pieza conectora.

Este paso es seguido por la ruptura de nueve columnas estriadas que son la continuación de las fibras densas del axonema. Estos eventos desenmascaran el centríolo proximal y le permite un libre acceso al citoplasma del oocito. Parece ser que el centríolo permanece asociado con al menos una de las columnas estriadas, lo que explica porque el espermatozoide permanece en la vecindad del pronúcleo masculino y huso mitótico a través del desarrollo pronuclear y embrionario (Sutovsky y col., 1996b).

Seguida su exposición al citoplasma oocitario, el centríolo proximal comienza a atraer el material pericentriolar hacia él. La presencia de γ tubulinas y otras proteínas centrosomales en el material pericentriolar, permite la enucleación de microtúbulos en una estructura radial llamada áster espermático. Los microtúbulos del áster espermático, proveen las vías para la aposición de los pronúcleos masculino y femenino (Schatten 1994) y facilitan el reclutamiento de complejo de poros nucleares preensamblados y otras moléculas y organelas para la formación de los compartimentos de los pronúcleos embrionarios (Sutovsky y col., 1998).

El centríolo original espermático se replica antes de la primera mitosis, durante la cual puede ser visto en uno de los polos del huso (Sathananthan y col., 1996). El centríolo hijo, proveniente de esa replicación, viaja hacia el lado opuesto del otro pronúcleo, donde este organiza el segundo polo del huso (Sathananthan y col., 1996; Sutovsky y col., 1996 a,b). Con todo esto, se podría afirmar que en mamíferos no roedores, el centrosoma es una organela heredada biparentalmente, ya que es una mezcla del centríolo aportado por el espermatozoide más el material pericentriolar de herencia materna.

3. Herencia materna del centrosoma en roedores y otras excepciones a la regla

Como fue mencionado anteriormente, los espermatozoides de roedores pierden ambos centríolos durante la espermiación y no contribuyen a la formación del centrosoma del cigoto. Este descubrimiento fue corroborado por estudios durante la fecundación en ratón que muestran que en vez de formarse un áster espermático único, se forman ásteres citoplásmicos múltiples de origen materno que ocupan el citoplasma del oocito fecundado y proveen la fuerza motriz para la aposición de los pronúcleos (Schatten y col., 1985, 1986). En oposición a otros euterios e incluso marsupiales, la biogénesis del centrosoma del cigoto está bajo estricto control materno. A pesar que las razones para tal diversificación evolutiva de la herencia del centrosoma son desconocidas, el mecanismo rudimentario de control centrosómico materno pudo haber sido retenido en mamíferos roedores y no roedores ya que se ha reportado activación partenogenética seguida de mitosis cuasi normal y desarrollo hasta el estadio de blastocisto. A pesar que los partonogenones mueren antes de alcanzar la

organogénesis, es muy posible que esto no sea debido a la ausencia de componentes paternos del centrosoma.

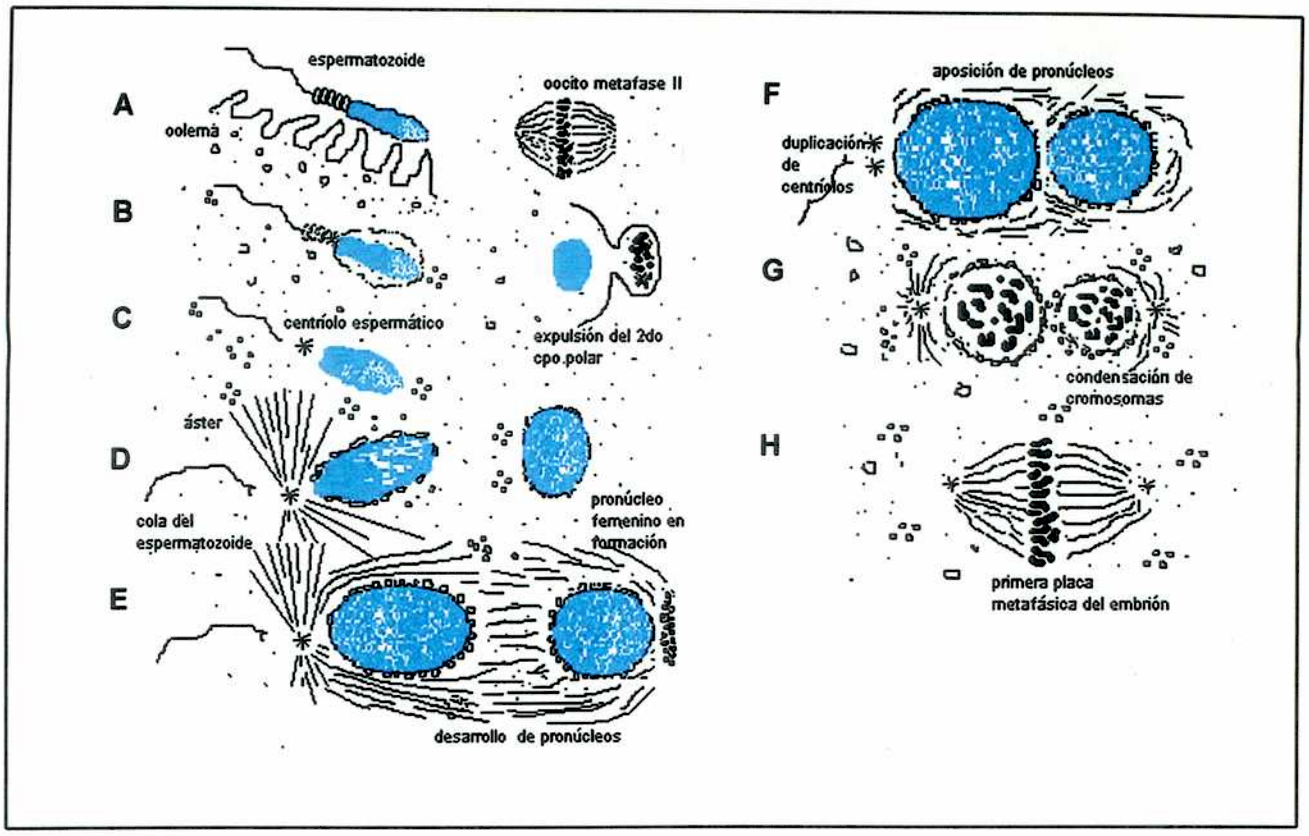
4. Requerimientos para la actividad del centrosoma en el momento de la fecundación y desarrollo de pronúcleos

Mientras que los microfilamentos y filamentos intermedios forman la red de citoesqueleto en los oocitos de mamíferos, el papel crucial de la movilidad de las organelas en los cigotos ha sido atribuído a los microtúbulos. Los microtubúlos proveen las vías a través de las cuales ocurre la aposición de los pronúcleos, mayormente desde el extremo menos (-) en donde existen proteínas motoras (Reinsch y Gonczy, 1998). El tratamiento de oocitos fecundados con nocodazol (un desorganizador de microtúbulos) impide la aposición y desarrollo de los pronúcleos (Navarra y col., 1994; Sutovsky y col., 1996b). Además de la movilidad de los pronúcleos, los microtubulos del áster espermático desempeñarían un importante papel en el desarrollo de los pronúcleos. El alargamiento de los pronúcleos y la construcción del esqueleto nuclear capaz de sostener la replicación del ADN, son procesos complejos que requieren un continuo influjo de moléculas desde el citoplasma (Pochia y Collas., 1996) (Figura 5). El desarrollo de pronúcleos también requiere la reconstitución de una membrana nuclear continua, desde vesículas de membranas citoplásmicas(Figura 5). El alargamiento posterior de los pronúcleos requiere del reclutamiento de mas vesículas de membranas hacia la región pronuclear en el citoplasma del cigoto, evento que es facilitado a través de los microtúbulos del áster espermático. De manera similar, los complejos de poros nucleares (CPN), que se preensamblan en láminas anulares (annulate lamellae) en el citoplasma del oocito durante la activación (Sutovsky y col., 1998b), también parecen estar transportados hacia los pronúcleos en desarrollo a través de los microtúbulos. La desorganización de los microtúbulos del áster espermático con Nocodazol impide la inserción de los CPN en la envoltura nuclear y el desarrollo y aposición de pronúcleos. Las láminas anulares servirían como vehículos para el rápido movimiento de los CPN preensamblados hacia los pronúcleos en desarrollo.

El movimiento citoplásmico de otras organelas que incluyen golgi, retículo endoplásmico y mitocondrias, podría estar gobernado por proteínas motoras asociadas a microtúbulos como la kinesina y dineína (Barnett y col., 1996; Sciaky y col., 1997; Terasaki y col., 1996). Este hecho también parece ser cierto para especies con herencia materna del centrosoma como por ejemplo el hámster, en donde el rearreglo de las mitocondrias y los filamentos intermedios del citoplasma durante la fecundación depende de los microtúbulos (Barnett y col., 1996). Otra pregunta interesante es saber si los microtúbulos del áster espermático

Figura 5. Representación esquemática de los primeros eventos durante la interacción de gametas humanas y el desarrollo de pronúcleos.

A: El espermatozoide se une y fusiona con el oolema mientras el oocito se encuentra detenido en metafase II (MII). B: El espermatozoide es deprivado de su teca perinuclear y envoltura nuclear durante su incorporación al citoplasma del oocito. En ese momento el oocito culmina la meiosis y expulsa el segundo cuerpo polar (CP). C: Luego de la incorporación del espermatozoide, algunas vesículas de membranas rodean a la cromatina del espermatozoide y se fusionan a su superficie formando una membrana nuclear continua que en ese estadio no posee todavía complejo de poros nucleares. D: De la misma manera, la cromatina materna se separa del citoplasma por la membrana nuclear que se formó por la fusión de vesículas de membranas sobre la superficie de la cromatina materna en descondensación. Al tiempo de formación de las envolturas nucleares, el centríolo espermático es liberado dentro del citoplasma del oocito y forma un áster de microtúbulos a partir de tubulinas oocitarias. E: Los complejos de poros nucleares se aproximan a la membranas nucleares en formación, mientras el áster se alarga. F: La inserción de los complejos de poros nucleares a los pronúcleos masculino y femenino provee un canal para el transporte núcleo-citoplásmico que promueve el desarrollo de los pronúcleos. Concomitantemente, ocurre duplicación de centríolos que luego migrará hacia el polo opuesto para asegurar una correcta formación del futuro huso mitótico. G: Los pronúcleos con su tamaño mayor permanecen enfrentados por la acción de los microtúbulos provenientes del áster espermático. Luego de la duplicación del ADN, comienza la recondensación del material genético y la destrucción de la membrana nuclear de cada uno de los pronúcleos. H: Las envolturas nucleares desaparecen por completo y los cromosomas maternos y paternos se alinean en una placa metafásica de la primera mitosis del embrión. *Adaptado por V. Rawe de ' Paternal Contributions to the Mammalian Zygote: Fertilization after Sperm-Egg Fusion'. International Review of Cytology, 195, 1-65, 1999.*


A
espermatozoide
oolema
oocito metafase II
B
C
centriolo espermático
expulsión del 2do
cpo polar
áster
D
pronúcleo
femenino en
formación
cola del
espermatozoide
E
desarrollo de pronúcleos
F
aposición de pronúcleos
duplicación
de
centriolos
G
condensación de
cromosomas
H
primera placa
metafásica del embrión

pueden facilitar el influjo de proteínas del citoplasma al pronúcleo en formación. Por ejemplo NuMA, una proteína de los polos del huso asociada al áster espermático, no requiere de los microtúbulos para su relocalización en el esqueleto de los pronúcleos donde reside durante su desarrollo (Navara y col., 1996c). Las proteínas centrosomales como la centrina y γ tubulinas también parecen ser reclutadas desde el citosol sin la participación activa de los microtúbulos (Navara y col., 1995). En contraposición, el reclutamiento de las láminas nucleares hacia los pronúcleos en desarrollo y replicación del ADN, al menos en ratón, depende del ensamblaje de microtúbulos (Schatten y col., 1989).

5. Factores que afectan el ensamblaje del centrosoma en el cigoto

Qué factores son necesarios para la reconstitución del centrosoma del cigoto de mamíferos?
Primero, parece que el desensamblaje de la pieza conectora del espermatozoide, requerida para la liberación del centríolo proximal dentro del citoplasma del oocito, depende de la reducción de los puentes di sulfuro en las mitocondrias espermáticas, columnas estriadas y capitolium. La eliminación del tripéptido glutatión (γ-glutamilcistein-glicina) a través de la inhibición de su síntesis (Meister y Anderson, 1983), reduce las tasas de formación del áster y aposición de pronúcleos en cigotos de bovinos, impidiendo la liberación del centríolo proximal desde la pieza conectora (Sutovsky y Schatten, 1997).
El tratamiento con un potente agente reductor de puentes di sulfuro como el ditiotreitol (DTT), emula el efecto de la reducción de puentes di sulfuro sobre la integridad de la pieza conectora (Sutovsky y col., 1997c). Dichos tratamientos son también necesarios para la reconstitución del centrosoma de mamíferos en un sistema libre de células compuesto por extractos de oocitos de *Xenopus* y espermatozoides de mamíferos permeabilizados (Navara y col., 1995).
Existen otros factores que contribuirían a la liberación del centríolo espermático desde la pieza conectora hacia el citoplasma del cigoto. Las columnas estriadas contienen una fosfoproteína de 84 kDa y otros sustratos de proteínas kinasas reactivas al anticuerpo MPM-2 (Long y col., 1997; Schalles y col., 1998). La fosforilación y desfosforilación de la pieza conectora han sido involucradas en la formación del áster en conejos (Pinto-Correia y col., 1994) y toros (Long y col., 1997). La liberación de iones de Ca^{2+} dentro del citoplasma del oocito durante la fecundación podría afectar la conformación y actividad de algunas proteínas en la pieza conectora del espermatozoide. La centrina, una proteína de pegado al Ca^{2+} con un papel probado de escisión flagelar (Sanders y Salisbury, 1989), también está presente en la pieza conectora del espermatozoide fecundante, y fue involucrada en la escisión de la cola

del espermatozoide de la fosa de implantación nuclear y en la regulación del ensamblaje del áster espermático (Zoran y col., 1994; Fechter y col., 1996).

La liberación del centríolo del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito es seguido por el ensamblaje del material perinuclear. Existen evidencias que involucran a las γ tubulinas y a por lo menos otras seis proteínas en el ensamblaje de los dímeros de α y β tubulinas. Un polímero con forma de anillo sirve como molde para el reclutamiento de los protofilamentos en sapos, mamíferos roedores y no roedores (Stears y Kirschner, 1994; Sutovsky y col., 1996b; Palacios y col., 1993; Zheng y col., 1995).

El centríolo espermático original se duplica dentro del centrosoma del cigoto y todo el centrosoma completo se divide mientras el centríolo hijo migra hacia el sitio del futuro polo del huso (Sathananthan y col., 1996; Sutovsky y col., 1996 a,b). En células somáticas, la duplicación de los centríolos parece estar bajo el control del ciclo celular vía el supresor tumoral p 53 (Cross y col., 1995, Fukasaway col., 1996). Los centríolos ubicados en los polos del primer huso mitótico dentro del oocito fecundado, se duplican una vez más antes de la primera mitosis (Sathananthan y col., 1996), lo que significa que un simple centríolo genera tres nuevos centríolos hijos durante el primer ciclo celular.

B. Remodelado del núcleo espermático y desarrollo de pronúcleos

1. Reducción de puentes di sulfuro y desenmascaramiento del ADN espermático

El núcleo de los espermatozoides maduros posee la cromatina hipercondensada y empaquetada por proteínas asociadas al ADN, llamadas protaminas. Las protaminas, y probablemente otras proteínas ricas en cisteinas, establecen puntes di-sulfuro durante su almacenamiento en epidídimo (Bedford, 1979; Calvin y Bedford, 1971). Las protaminas son reemplazadas por histonas derivadas del oocito durante la fecundación ya que la estructura tridimensional de éstas no permite la replicación de ADN (Ecklund y Levine, 1975; Krzanowska, 1982; Kopecny y Pavlok, 1975). Este evento está acompañado por la descompactación de la estructura nuclear del espermatozoide y por la descondensación del núcleo espermático que depende de la reducción de los puentes di-sulfuro a cargo del tripéptido glutatión de origen oocitario (Meister y Anderson, 1983; Perreault, 1984, 1990; Sutovsky y Schatten, 1997). El glutatión también parece facilitar el desensamblaje de la pieza conectora que alberga al centríolo espermático y favorecer a la formación del primer huso mitotico (Zuelke y col., 1997). Este mecanismo de decondensación del núcleo espermático, inducido por el oocito, está restringuido a los mamíferos, ya que otros vertebrados no poseen

la capacidad de estabilisar las estructuras accesorias espermáticas durante el almacenamiento espermático (Bedford, 1979).

2. Formación de la envoltura nuclear alrededor del pronúcleo en desarrollo

A continuación o quizá concomitante con la remoción de la membrana plasmática y la teca perinuclear del espermatozoide, el núcleo masculino es deprivado de su cubierta nuclear en el momento de entrar en contacto con el citoplasma del oocito (Usui, 1966; Usui y Yanagimachi, 1976; Usui y col., 1997). De la misma manera, el núcleo del oocito es deprivado de su envoltura nuclear luego de la ruptura de la vesícula germinal (Stricker y Schatten, 1989). La nueva envoltura nuclear es reconstituída alrededor del núcleo espermático en decondensación a partir de membranas de vesículas oocitarias (Collas y col., 1996; Pasteels, 1963; Poccia y Collas, 1996; Sutovsky y Schatten, 1997). Ese paso universal en la fecundación marca la formación de compartimentos nucleares y citoplásmicos en el oocito fecundado y conlleva la necesidad de establecer una comunicación bidireccional y un intercambio de moléculas necesarias para el desarrollo pronuclear y embrionario normal. El canal principal para el transporte nucleoplásmico en células animales es el complejo de poros nucleares (CPN) y proteínas O-glicosiladas de la familia de las nucleoporinas (Pante y Aebi, 1996).

Existen tres pasos distintos y requerimientos energéticos específicos que están involucrados en la reconstitución de la membrana nuclear sobre la superficie "desnuda" de la cromatina del espermatozoide y del oocito (Boman y col., 1992; Macaulay y Forbes, 1996; Meier y col., 1995; Newport, 1987; Pfaller y col., 1991):

(i) Fusión de membranas para formar una continua envoltura nuclear con gasto de ATP y GTP

(ii) Formación/inserción (dependiente de Ca^{2+}) de CPN en la envoltura nuclear en formación

(iii) Ensamblaje de una lámina nuclear bajo la envoltura nuclear

Se encuentra aún en discusión si la lámina nuclear se ensambla antes, durante o luego del ensamblaje de la envoltura nuclear y el CPN.

Se conoce relativamente poco acerca de los requerimientos y cronología de ensamblaje de la membrana nuclear durante la fecundación en mamíferos. Algunos estudios mostraron que el ensamblaje de una membrana nuclear funcional con el CPN ocurre casi inmediatamente luego

de la incorporación del espermatozoide, de la decondensación de su núcleo y que este evento es dependiente de Ca^{2+} en bovinos (Sutovsky y col., 1998).

En cigotos de bovinos, el ensamblaje perinuclear de las láminas anulares parece estar controlado por el áster espermático. Como consecuencia, la despolimerización de los microtúbulos del áster bloquea el desarrollo pronuclear y el ensamblaje de CPNs. El ensamblaje de la envoltura nuclear en mamíferos parecería estar regulada por una baja en la actividad de las MAPs kinasas citoplasmáticas (Moos y col., 1995) y la actividad del MPF (Usui y col., 1997). El transporte entre citoplasma y núcleo mediado por CPN es el que va a dirigir el crecimiento de ambos pronúcleos (Sutovsky y col., 1998b).

3. Cronología de la formación de cigotos con dos pronúcleos

En un estudio realizado por Capmany y col.(1996) se describe el tiempo de formación de pronúcleos, ruptura, síntesis de DNA y clivaje durante el primer ciclo celular en humanos. Según los resultados provenientes de este estudio, de 121 ovocitos inseminados luego de FIV y 125 re- inseminados, se concluyó que el momento en el que se forman dos pronúcleos se encuentra entre 3-10 horas post inseminación (hpi). Balakier y col. (1993) también estudiaron el tiempo de formación de pronúcleos en cigotos humanos y se afirma que este evento ocurre luego de 10 hpi. La fase G1 dura aproximadamente 5 horas, la síntesis de DNA (fase S), que coincide con la formación de los pronúcleos, comienza entre 8-14 hpi y en la mayoría de los embriones se completa entre las 14- 22 hpi. El resto de las etapas del ciclo celular se esquematizan en la Figura 6.

El momento de ruptura de la membrana nuclear (NEBD) de los pronúcleos varía considerablemente entre embriones (entre 21-31 hpi), así como también el tiempo en el que ocurre el primer clivaje (25-31 hpi). Se puede considerar que la mayoría de los embriones sufren NEBD entre 27-30 hpi y el primer clivaje entre 29-32 hpi. Estos hallazgos se correlacionan con los encontrados por Balakier y col. (1993) y Van Wissen y col. (1995) luego de FIV, aunque luego de ICSI la NEBD y el primer clivaje embrionario ocurren entre 2-4 horas más temprano (Nagy y col., 1994).

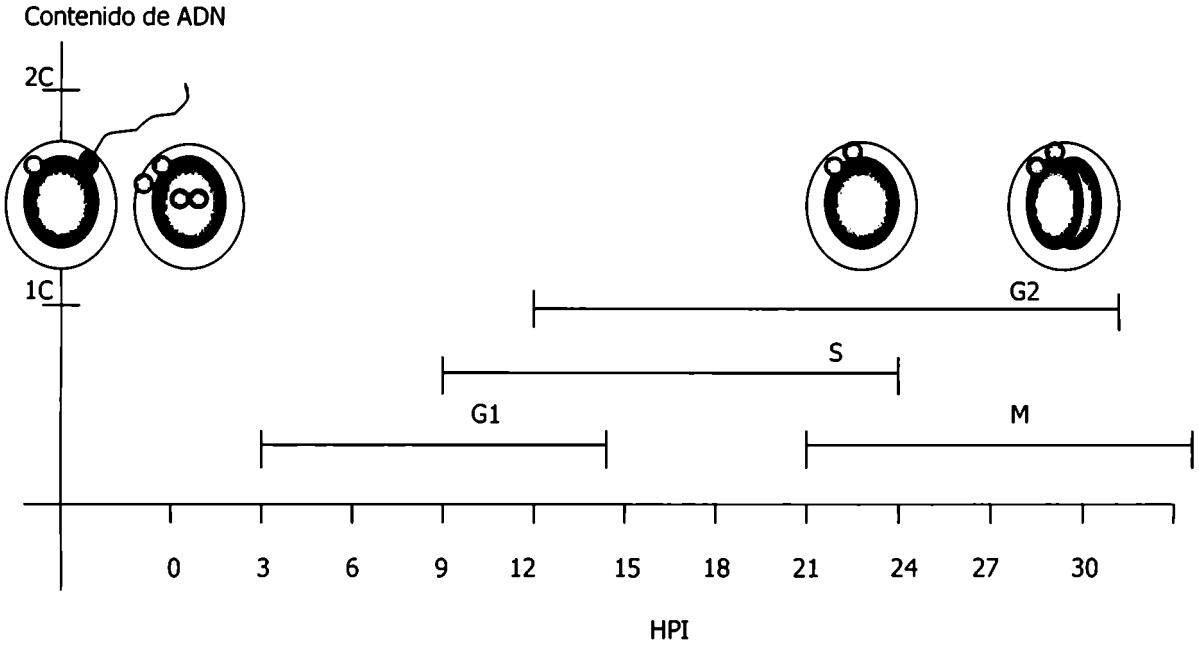


Figura 6. Cronología de los distintos eventos que ocurren durante el primer ciclo celular en humanos. *(Extraído de Capmany y col., 1996).*

4. Desarrollo pronuclear y replicación del ADN

La remoción de las protaminas desde el núcleo espermático ocurre varias horas después de la activación oocitaria (Colleau y col., 1997; Krzanovska, 1982; Kopecny y Pavlok, 1975). Además del glutatión, otras proteínas importadas desde el citoplasma del oocito están involucradas en la decondensación de la cabeza del espermatozoide durante la fecundación en mamíferos y otros vertebrados (Yanagimachi, 1994).

La cronología del desarrollo pronuclear ha sido descripta in vivo in cigotos de chancho, en donde empieza aproximadamente 56 hs luego del estímulo de ovulación y dura no más de 4 hs (Laurincik y col., 1998). La fase S en bovinos está acompañada por la aparición de cuerpos organizadores nucleolares que, sin embargo, no se transforman en nucleolos activos hasta el estadío de ocho células (Lavoir y col., 1997; Kopecny y col., 1989). Un factor involucrado en la culminación de la fase S pronuclear en mamíferos y sapos es la importación nuclear de la Histona H1 (Lin y Clarke, 1996). Se cree también que existen otros factores provenientes del citoplasma del cigoto necesarios para regular la replicación del ADN. Para asegurar el desarrollo pronuclear sincrónico, los oocitos poseen una actividad supresora que previene el desarrollo pronuclear femenino durante las primeras horas luego de la activación oocitaria (Fulka y col., 1996). El desarrollo del pronúcleo masculino parece estar sincronizado con la finalización de la meiosis del oocito y con el desarrollo del pronúcleo femenino. La disrrupción

de la meiosis del oocito con el tratamiento con colchicina previene el alargamiento del pronúcleo masculino en hámster (Wright y Longo, 1988).

Hewiston y col., (1999) han demostrado que la persistencia de la teca perinuclear en la superficie apical de la cromatina del espermatozoide retrasa la replicación de ADN en el pronúcleo masculino y la salida de la fase S en ambos pronúcleos luego de Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides en monos *Rhesus*. Este retraso podría deberse a la existencia de distintos puntos de chequeo de la replicación entre el pronúcleo masculino y femenino. El desarrollo asincrónico de los pronúcleos masculino y femenino, se ha correlacionado con un desarrollo embrionario aberrante y un incremento en el nivel de mosaicismo (Sadowy y col., 1998). A pesar que la mayoría de los estadios del desarrollo pronuclear parecen estar sincronizados por un mecanismo en común para ambos pronúcleos, existen evidencias de que algunos factores estarían involucrados en el desarrollo del pronúcleo masculino pero no femenino. Entre esos factores se encuentran proteína kinasas o sustratos de kinasas específicos del pronúcleo masculino. También el desarrollo del pronúcleo masculino pero no el femenino, puede ser suprimido por inhibidores de la fosforilación de proteínas temprano luego de la inseminación pero no durante estadios más tardíos del desarrollo pronuclear (Chian y col., 1999). Por lo tanto pareciera ser que los pronúcleos femenino y masculino en un estadio temprano de la fecundación, siguen patrones individuales que convergen en un mecanismo de control común antes de la primera ronda de replicación del ADN.

CAPITULO III

INTERACCIÓN ANORMAL ESPERMATOZOIDE-OOCITO

Cigotos con un pronúcleo

Para cada especie estudiada hasta el momento, la singamia entre el pronúcleo masculino y femenino sigue dos patrones generales:

a) En el primero, los pronúcleos se asocian muy cercanamente, a veces con interdigitaciones en la porción de las membranas nucleares que se oponen, pero sin real fusión antes que esas membranas se rompan. Este prototipo de interacción entre pronúcleos fue originalmente descripto por Wilson, 1925, en el gusano *Ascaris* y es característico de oocitos que son fecundados ANTES de la finalización de la meiosis (modelo humano).

b) En el segundo patrón de singamia, la fusión ocurre luego de la asociación de los pronúcleos con la formación de un cigoto con un solo pronúcleo (1PN). La fecundación en el erizo de mar es representativa de este patrón de interacción pronuclear que ocurre en oocitos que son fecundados LUEGO que completaron la meiosis.

En el humano, la interacción de los pronúcleos paterno y materno, se caracteriza por una cercana asociación de ambas membranas nucleares con alineamiento cercano de los nucleolos. La ruptura de las membranas pronucleares y el comienzo de la primera división mitótica se realiza SIN la fusión real de esas envolturas.
La expulsión del segundo cuerpo polar (2PB) y la formación simultánea de 1PN ocurre entre el 2-5% en oocitos humanos luego de Fecundación in Vitro (FIV) (Abramczuk y Lopata, 1990; Winston y col., 1991), y entre el 29-80% de esos cigotos son diploides (Plachot y col.,1989; Staessen y col., 1993). Los embriones diploides derivados de cigotos con 1PN se pueden generar a partir de distintos eventos:

activación partenogenética y subsecuente diploidización (Kaufman, 1983)
desarrollo asincrónico de pronúcleos (Staessen y col., 1993)
luego de la fusión de pronúcleos (Wilson, 1925; Longo, 1973)

Los embriones con un set haploide de cromosomas pueden provenir de partenogénesis, ginogénesis o androgénesis.
Se denomina partenogénesis, al desarrollo de un oocito conteniendo sólo el genoma femenino sin intervención de la gameta masculina.

Se denomina ginogénesis al desarrollo de un oocito fecundado espontáneamente o experimentalmente por un espermatozoide genéticamente inactivo.
Androgénesis es el desarrollo de un oocito que contiene sólo el genoma masculino y en donde el femenino ha sido eliminado o es genéticamente inactivo.

Munné y col.(1993), usando FISH y PCR describieron que alrededor del 80% de los cigotos de 1PN luego de FIV podían ser considerados fecundados. Este evento sugiere que los pronúcleos masculino y femenino se descondensan asincrónicamnete o bien se fusionan en un único pronúcleo, evento que ha sido descripto en varias especies primitivas como el erizo de mar (Wilson, 1925). Munné y col.(1993),sugieren que esos embriones pueden ser transferidos si no existe ningún otro disponible. De hecho, el nacimiento de un niño luego de FIV con transferencia de un cigoto con 1PN y 2CP ha sido reportada por Staessen y col. (1993).

Palermo y col. (1993) y Van Steirteghen y col. (1993a,b), reportaron que luego de ICSI la proporción de cigotos con 1PN se encuentra en el rango de 5,3-26,8%.La ocurrencia de embriones provenientes de 1PN luego de ICSI es más frecuente comparado con FIV 11.4% vs. 4.5% respectivamente (Abramczuk y Lopata, 1990; Winston y col., 1991).
Sultán y col., (1995) realizando FISH con una sonda especifica para el cromosoma Y sobre embriones que habían fertilizado anormalmente luego de FIV (1PN), encontraron que hubo fecundación en el 48% de ellos y por extrapolación el 96% de esos embriones derivaban de oocitos fecundados. Más aún, la mayoría de esos oocitos eran diploides. Por el contrario, el ensayo reveló que sólo el 9.5% de los 1PN derivados de ICSI tenían un cromosoma Y presente y el 67% eran diploides. Este hallazgo indica que los embriones de 1PN provenientes de ICSI resultan de oocitos activados. Se puede concluir que, de no quedar otra alternativa, los embriones de 1PN provenientes de FIV podrían ser transferidos pero no los provenientes de ICSI.

A mediados de la década del 70', Witkowska (1973) observó que algunos oocitos partenogenéticamente activados extrudaban pequeños fragmentos citoplásmicos hacia el espacio perivitelino. Este evento se da con una baja frecuencia (aún no bien cuantificada), luego de 6-8 hs. de la activación en oocitos de ratón y puede ser consecuencia de cualquier estímulo activador independientemente de su naturaleza. Witkowska sugirió que la expulsión de fragmentos de citoplasma tenía relación con una reacción cortical anormal luego de la activación. Aunque todavía las causas no están bien determinadas, se cree que esta situación refleja al menos un aumentado grado de inestabilidad de la membrana plasmática del oocito.

De manera alternativa, este evento podría estar relacionado con un daño de elementos del citoesqueleto asociados con la membrana celular, inducido en el mismo momento o poco después de la activación. Usualmente, la presencia de estos fragmentos es ignorada quizá por su pequeño volumen comparado con el citoplasma oocitario. En relación con esta observación, es bastante frecuente confundir estos fragmentos con cuerpos polares con lo cual se debe tener especial cuidado en la correcta visualización.

Cigotos con tres pronúcleos

Los embriones con tres pronúcleos pueden ser digínicos o diándricos. El set de cromosomas extra en los embriones digínicos tiene un origen materno y puede derivar de la fecundación de un oocito con un número diploide de cromosomas. Contrariamente, el set extra de cromosomas en los triploides diándricos tiene un origen paterno y puede resultar de la fecundación de un oocito normal (haploide) por un espermatozoide diploide o por dos espermatozoides (dispermia).

Plachot y Crozet hallaron un 3,8% de fecundación triploide luego de FIV y el 86% de los triploides resultaron de la diandria. Un evento común es observar una mayor tasa de triploidía (50%) cuando se inseminan oocitos ´viejos´ (> 24hs post captación). En los oocitos viejos decrece la protección contra la poliespermia ya que existe una migración centrípeta de los gránulos corticales hacia el centro de la célula. El 82% de los triploides comparado con el 92% de los embriones diploides proceden hacia las dos primeras divisiones. Más aún, el 50% de los embriones con tres pronúcleos tienen un clivaje característico de tres células a seis células, mientras que los embriones diploides en la mayoría de los casos lo hacen de dos a cuatro células.

En general, la triploidía está asociada con gametas de pobre calidad; por un lado se observó que el uso de semen congelado está significativamente asociado con el riesgo de recurrencia del fenómeno (37%) cuando se lo compara con pacientes que no tuvieron cigotos tripronucleados o los tuvieron sólo en un ciclo. Estos datos sugieren que el congelamiento del semen induce una demora en la fecundación y por lo tanto un envejecimiento oocitario. Royere y col. (1988) observaron una demora en la aparición de los pronúcleos cuando se usa semen congelado, sugiriendo un retraso en la interacción espermatozoide- oocito o un retraso en la formación de los pronúcleos. El oocito añoso por su lado, sufre una migración de los gránulos corticales hacia el centro de la célula, un deterioro en la reacción cortical y la consecuente poliespermia luego de FIV.

Como es evidente, una mala calidad en las gametas tendrá su impacto en la futura calidad embrionaria, ya que se ha visto que la recurrencia de cigotos triploides correlaciona con una

disminución en el número de embriones de buena calidad, cuando se lo compara con pacientes sin triploidía o con solo triploidía en un ciclo.

Cigotos con cuatro o más pronúcleos

En general el número y el tamaño de pronúcleos presentes dependen del número de cromosomas involucrados y si éstos permanecen agrupados o no (Austin, 1969). Alguno (s) de los pronúcleo (s) observado (s) luego de la fecundación puede ser producto de la formación de subnúcleos maternos (también llamadas cariomeras maternas). Este es un evento poco frecuente en donde se origina la formación de algunos pequeños pronúcleos en lugar de un úrnico pronúcleo femenino de mayor tamaño. Una posible explicación es que haya existido dispersión de cromosomas antes de la fecundación y que luego se haya formado alrededor de ellos una membrana nuclear que los agrupó. Otra posibilidad (no excluyente) es que la formación de los pronúcleos provenga de la fecundación de un oocito por dos espermatozoides (dispermia) y de la falta de expulsión del segundo cuerpo polar.

La incidencia de subnucleados en el ratón no es usualmente mayor que el 0,2% y parece estar genéticamente determinada (Braden, 1957). Sin embargo la incidencia parece ser mayor particularmente cuando los oocitos de ratón son tratados in vitro con calor (Austin y Braden, 1954; Komar, 1973) o luego de la administración de colchicina (Edwards, 1958a,b).

El desarrollo subsecuente de cigotos con subnúcleos depende esencialmente de sí los cromosomas dentro del subnúcleo se ensamblan en el huso del primer clivaje o fallan en hacerlo. Este evento es reconocido como una consecuencia común de envejecimiento oocitario en mamíferos y en vertebrados no mamíferos (Austin, 1969).

La ocasional formación de subnúcleos en vez de uno o dos núcleos haploides o un pronúcleo diploide también fue hallada en material partenogenético como causa directa del daño provocado al citoesqueleto por el estímulo activador.

CAPÍTULO IV
OTRAS POTENCIALES CONTRIBUCIONES PATERNAS

A. Eliminación de las mitocondrias paternas y estructuras accesorias de la cola del espermatozoide

1. Eliminación de las mitocondrias del espermatozoide durante la fecundación

Se ha visto que las mitocondrias del espermatozoide son eliminadas dentro del citoplasma de bovinos a medida que progresa el ciclo celular embrionario (Sutovsky y col., 1996). Este hecho permite sugerir que la ubicuitina, un polipéptido pequeño (8,5 kDa) que controla el ciclo celular a través de la destrucción de la ciclina (componente del MPF), podría estar asociado a la eliminación de las mitocondrias paternas. Sutovsky y col., (1998) demostró el pegado de la ubicuitina a las mitocondrias del espermatozoide que se incorpora al citoplasma de oocitos de bovinos.

La mayoría de las proteínas citosólicas e incluso algunas de membrana son ubicuitinadas como mecanismo de eliminación. El proceso comienza con la activación de la molécula de ubicuitina de 8,5 kDa y la enzima E1, seguida de la conjugación de la ubicuitina activada a los residuos lisina del sustrato, evento que es asistido por la enzima E2 conjugada a ubicuitina y la enzima ubicuitina ligasa E3. Luego, múltiples moléculas de ubicuitina se adicionan a sustratos monoubicuitinados, formando un polímero de ubicuitina que guía a la proteína blanco hacia el sitio de destrucción, en un proteasoma o lisosoma (Chau y col., 1989). La ubicuitinación puede ocurrir de una manera no específica (se ubicuitinan los residuos de lisina de proteínas dañadas o desplegadas) o de manera específica guiada por ligandos.

Las mitocondrias del espermatozoide son rotuladas por algunas moléculas de ubicuitina durante la espermiogénesis, especialmente en el estadio de espermatocito secundario y espermátide redonda. Existe un enmascaramiento temporario del rótulo de ubicuitina en las mitocondrias paternas dado por la presencia de puentes disulfuro, durante el pasaje por epidídimo y el transporte uterotubal. Luego de la incorporación de la vaina de mitocondrias al citoplasma del oocito y la reducción de los puentes disulfuro, la ubicuitina derivada del oocito reconocen el rótulo de ubicuitina de la mitocondrias paternas y una larga cadena de ubicuitinas se adhiere a las mitocondrias de manera de proveer el sitio de reconocimiento de lisosomas y/o proteasomas.

Las proteínas de las mitocondrias son ricas en lisina, especialmente las de la membrana mitocondrial externa, hecho que provee un sitio ideal de pegado de ubicuitina. El alto porcentaje de residuos de cisteína responsables de la formación de los puentes di-sulfuro

explica por qué es necesaria la reducción de estos puentes para obtener el pegado de los anticuerpos anti-ubicuitina en espermatozoides de eyaculado pero no en espermatozoides testiculares. La formación de puentes di sulfuro durante el pasaje por epididimo (maduración), le da rigidez a la vaina mitocondrial de los espermatozoides de mamíferos.

2. Eliminación de las fibras densas externas y dobletes de microtúbulos en el citoplasma embrionario

El axonema del espermatozoide es una estructura compleja, compuesta por dobletes de microtúbulos en una conformación 9+2, rodeados de manera paralela por nueve fibras densas externas (FDE) en la pieza principal y pieza media. En la pieza conectora, las FDE se transforman en nueve columnas estriadas que asocian el axonema al plato basal del núcleo espermático y que están delimitadas por el capitolium y encierran al centríolo espermático. La pieza principal está cubierta por la vaina fibrosa y la pieza media y conectora cubierta por la vaina mitocondrial (Fawcett, 1975; Sutovsky y col., 1996b, Sutovsky y Schatten, 1997). Durante la fecundación, las mitocondria paternas son removidas, desenmascarando las columnas estriadas de la pieza conectora que son subsecuentemente separadas del núcleo espermático y eventualmente desmanteladas (Sutovsky y col., 1996 a,b). Este evento permite la liberación del centríolo espermático en el citoplasma del cigoto y su transformación en el centrosoma activo del cigoto (Le Guen y Crozet, 1989; Sutovsky y col., 1996b). De manera similar, la vaina fibrosa se disuelve en unas pocas horas luego de la incorporación del espermatozoide en bovinos (Sutovsky y col., 1996b). Las FDE y la vaina mitocondrial persisten en el citoplasma del cigoto hasta el primer clivaje embrionario. Los microtúbulos persisten en el citoplasma del cigoto por varios ciclos celulares embrionarios (Austin, 1961; Simerly y col., 1993a; Szollosi, 1976). El desensamblaje de la vaina mitocondrial y de las columnas estriadas estarían facilitados por el glutatión presente en el oocito (Sutovsky y Schatten, 1997), y el desmantelamiento de la pieza conectora podría estar mediado por eventos de fosforilación y des fosforilación (Pinto Correia y col., 1994; Long y col., 1997) y por la acción de la proteína centrina asociada al Ca^{2+} (Fechter y col., 1996). Los mecanismos que participan en la destrucción de la vaina fibrosa y FDE son desconocidos pero parece que al menos la ubicuitina no participaría en tal evento. Es posible que algunas kinasas y otras enzimas que se adhieren a las estructuras del axonema contribuyan en ese proceso. La vaina fibrosa contiene la enzima hexokinasa (Kalab y col., 1994) y la proteína de anclaje de la kinasa A (AKAP; Carrera y col., 1994).

OBJETIVOS

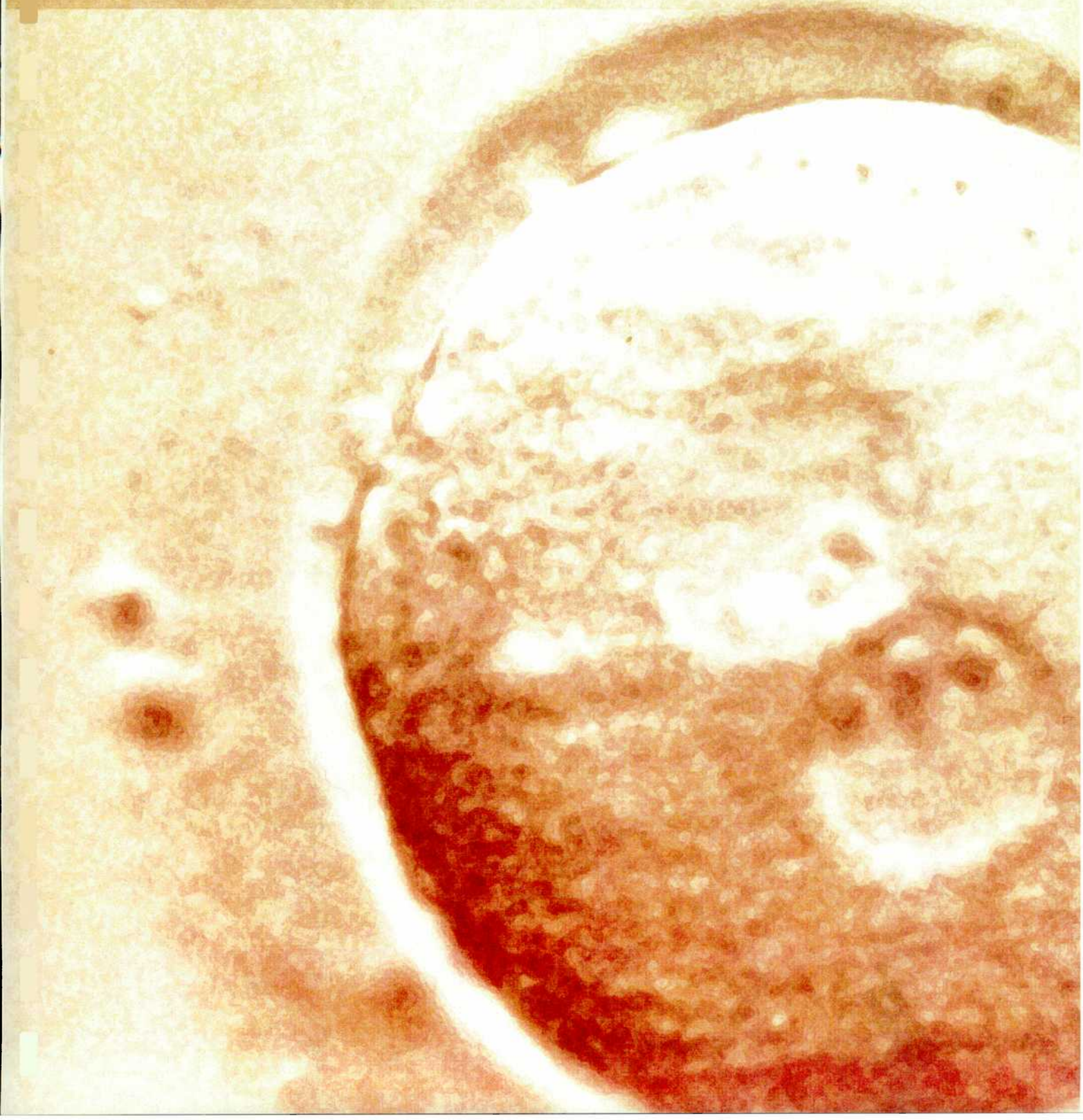
El objetivo principal de la presente investigación fue analizar los eventos celulares involucrados en la aparición de dos fenómenos frecuentes que caracterizan la detención precoz del desarrollo embrionario en humanos:

a. Falla de fecundación: Bajo esta denominación se contempla a toda desorganización espacio-temporal de la dinámica del desarrollo del primer ciclo celular del cigoto, manifiesta a través de la alteración de los eventos morfológicos que lo caracterizan y que da como resultado la detención del desarrollo antes de la primera división mitótica del embrión.

b. Fecundación anormal: El término fecundación anormal se refiere a toda alteración en los niveles de ploidía del embrión, aunque no derivada de gametas con desbalances cromosómicos sino de la desorganización en la formación de los pronúcleos masculino y femenino con alteración de la condición diploide normal. A diferencia de lo que ocurre en la falla de fecundación en la que los cigotos detienen su desarrollo antes de la primera citocinesis, los embriones fecundados anormalmente suelen ser capaces de clivar. Mas aún, las alteraciones en los niveles de ploidía tienen efectos marcados en las etapas peri y post-implantación causando pérdida embrionaria, alteraciones morfológicas del desarrollo y desregulación de los mecanismos de impronta genómica.

Tradicionalmente ambos fenómenos, en especial la falla de fecundación, han sido explicados por el desbalance cromosómico de la gametas masculinas y/o femenina al momento de la fecundación. Alternativamente, la detención precoz del desarrollo en embriones humanos puede tener su origen en alteraciones de la dinámica de reorganización citoesqueletaria, producto de desarreglos en los ritmos de oscilación de las concentraciones de Ca^{2+} intracitoplásmica que actúan como reguladores del primer ciclo celular embrionario. Este origen de la alteración del desarrollo no depende necesariamente de desbalances cromosómicos, aunque estos puedan tener lugar al mismo tiempo.
Para poner a prueba este postulado, se estudiaron oocitos que mostraron falla de fecundación o fecundación anormal, a través del análisis del citoesqueleto (tubulinas), organización del ADN pronuclear materno y paterno, organización del aster, y activaciones abortivas de manifestación citológica.

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIAL DE ESTUDIO: OBTENCIÓN Y CLASIFICACIÓN

II. PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

1- RECOLECCIÓN Y PREPARACION DE OOCITOS

2- PREPARACIÓN DE SEMEN

A. Evaluación inicial de la muestra de semen

B. Métodos de separación

C. Procesamiento de las muestras según su clasificación

D. Procedimientos

E. Soluciones y medios de cultivo

3- FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

4- INYECCIÓN INTRACITOPLÁSMICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

III. INMUNOCITOQUIMICA

1- PROCEDIMIENTO

2- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

IV. ANÁLISIS CROMOSÓMICO

1- PROCEDIMIENTO

2- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

I. MATERIAL DE ESTUDIO: OBTENCIÓN Y CLASIFICACIÓN

FALLA DE FECUNDACIÓN

El material utilizado fueron oocitos clasificados como 'no fecundados' entre las 20-40 hs. post inseminación (FIV) o inyección (ICSI), en el Programa de Reproducción Asistida de CEGyR. También se incluyeron oocitos que habían detenido su fecundación en el estadio de dos pronúcleos. Se consideró oocito no fecundado a aquel en el que no se visualiza la aparición de pronúcleos bajo microscopio de luz trasmitida (1000x) y a aquellos en los que ocurrió el desarrollo de pronúcleos pero no culminaron con el proceso de fecundación luego de FIV o ICSI (Figura 7).

- Inmunofluorescencia

El número total de oocitos sin desarrollo de pronúcleos y con desarrollo detenido visualizados con microscopio de luz transmitida y estudiados por inmunofluorescencia fue de **626**, provenientes de 149 pacientes que obtuvieron oocitos 'no fecundados' luego de la realización de FIV e ICSI. De los 626 oocitos que fallaron en algún estadio durante la fecundación, 594 fueron analizables por inmunofluorescencia (94,9%), 265 luego de la realización de FIV y 329 luego de ICSI para la detección de β- tubulinas, α- tubulinas acetiladas y tinción del material genético.

- Análisis cromosómico

El número total de oocitos sin desarrollo de pronúcleos y con la expulsión de dos cuerpos polares visualizados con microscopio de luz transmitida y estudiados con la Técnica de Tarkowski fue de **189** luego de la realización de FIV y/o ICSI en 82 pacientes. Del total, 135 fueron informativos (71,4%), 61 provenientes de FIV y 74 de ICSI.

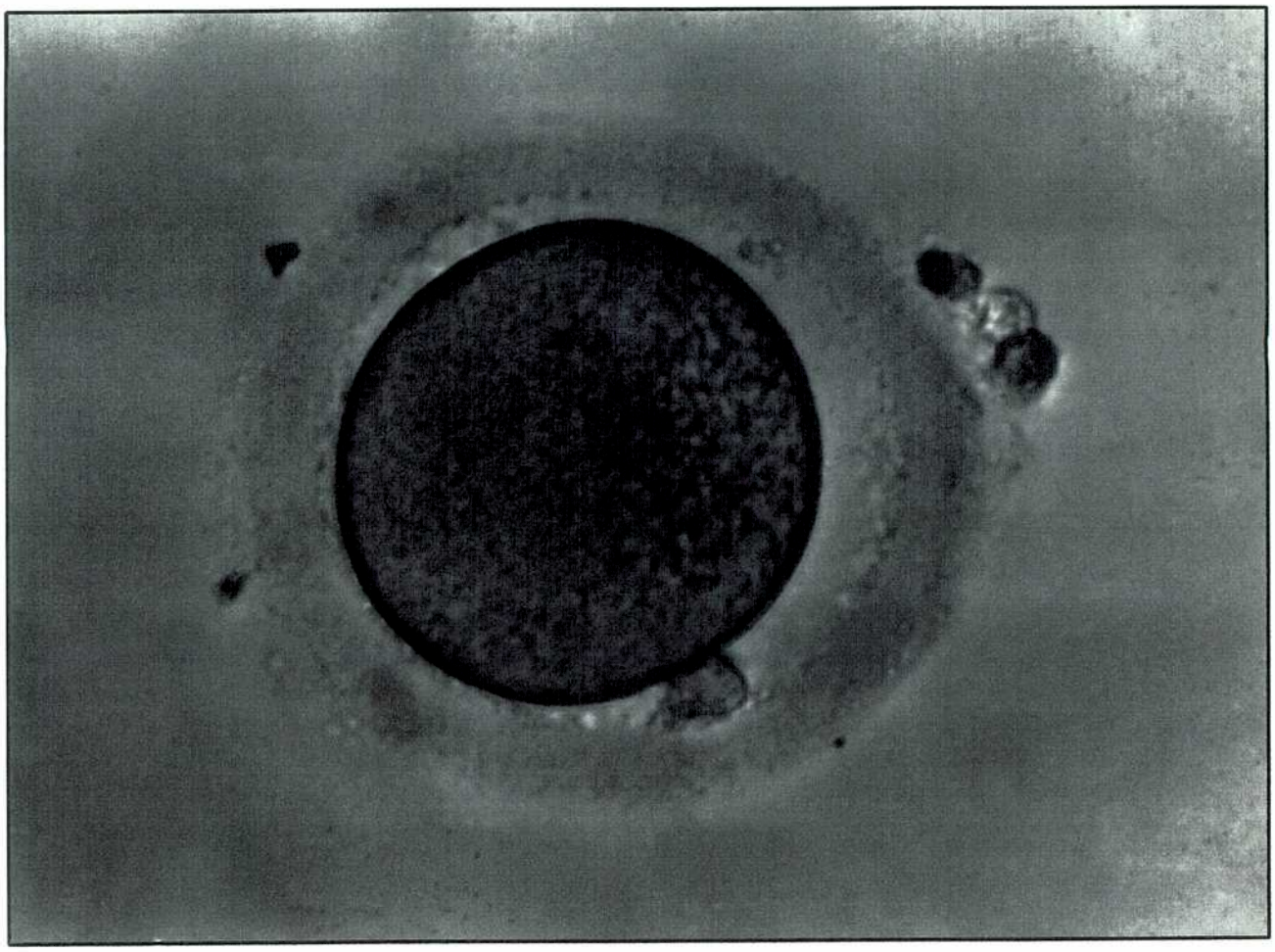
FECUNDACIÓN ANORMAL

- Inmunofluorescencia

El material utilizado en este estudio fueron cigotos clasificados como 'fecundados anormalmente' entre las 12-18 hs. post inseminación (FIV) o inyección (ICSI). Se considera oocito 'fecundados anormalmente' a aquel que desarrolla un pronúcleo (1PN), tres pronúcleos

Figura 7. Oocito aparentemente no fecundado luego de ICSI.

La observación por microscopía óptica permite visualizar que la formación de los pronúcleos masculino y femenino no ha ocurrido en apariencia. Se observa un citoplasma homogéneo junto con la expulsión de un solo cuerpo polar. La zona pelúcida rodea a todo el espacio perivitelino. *Fotografía tomada por V. Rawe en el Laboratorio de Embriología de CEGyR.*



(3PN), con cuatro o más pronúcleos (4PN) y con tres o más subnúcleos (≥3SN), con la presencia de uno o dos cuerpos polares (1CP o 2CP) en cada caso.

El número total de oocitos visualizados con microscopio de luz transmitida y estudiados por inmunofluorescencia fue de **153**, proveniente de 55 pacientes luego de la realización de FIV e ICSI. De los 153 oocitos fecundados anormalmente, el 100% fueron analizables por inmunofluorescencia, 84 luego de la realización de FIV y 69 luego de ICSI. Luego de la visualización bajo microscopio óptico para el estudio detallado de la presencia de cuerpos polares y tamaño/ forma de los pronúcleos observados, el material fue procesado por inmunofluorescencia para la detección de α y β- tubulinas (citoesqueleto del oocito), α-tubulinas acetiladas (cola del espermatozoide) y tinción del material genético (Hoescht 33258).

II. PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

1- RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE OOCITOS

A. FECUNDACIÓN IN VITRO

La punción folicular se realiza en quirófano bajo anestesia completa. Una vez efectuada la punción folicular, el material recuperado se coloca en el interior de un tubo plástico de 13 ml (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) que contiene PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Gibco BRL, Life Technologies, USA) a 37ºC como medio de transporte. El material así recuperado se vuelca en una cápsula redonda de 100x20 mm (Corning, NY, USA) sobre platina térmica (Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, ILL, USA) a 37ºC y se procede a la búsqueda de los complejos cúmulus-oocito (COC´s) bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-10, H&H Optical Instruments, Santa Cruz, CA, USA) a un aumento de 40x. Una vez identificados los COC´s se los levanta con una pipeta Pasteur (Costar, Cambridge, MA, USA) y se los coloca en el interior de una cápsula redonda de 60x15 mm (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) que contiene PBS, la que se encuentra sobre platina térmica, y se los lava por aspiración con pipeta Pasteur. Luego, usando la pipeta Pasteur se los pasa al interior de tubos plásticos de 5 ml (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) que contienen 1 ml de medio Human Tubal Fluid (Irvine Scientific, USA) suplementado con 15% de Synthetic Serum Substitute (Irvine Scientific, USA) (HTF-SSS). Así se los deja en estufa (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA) a 37ºC y atmósfera de 5% de CO_2 hasta el momento de la inseminación (entre 4 y 6 horas mas tarde).

B. INYECCIÓN INTRACITOPLASMICA DE ESPERMATOZOIDES

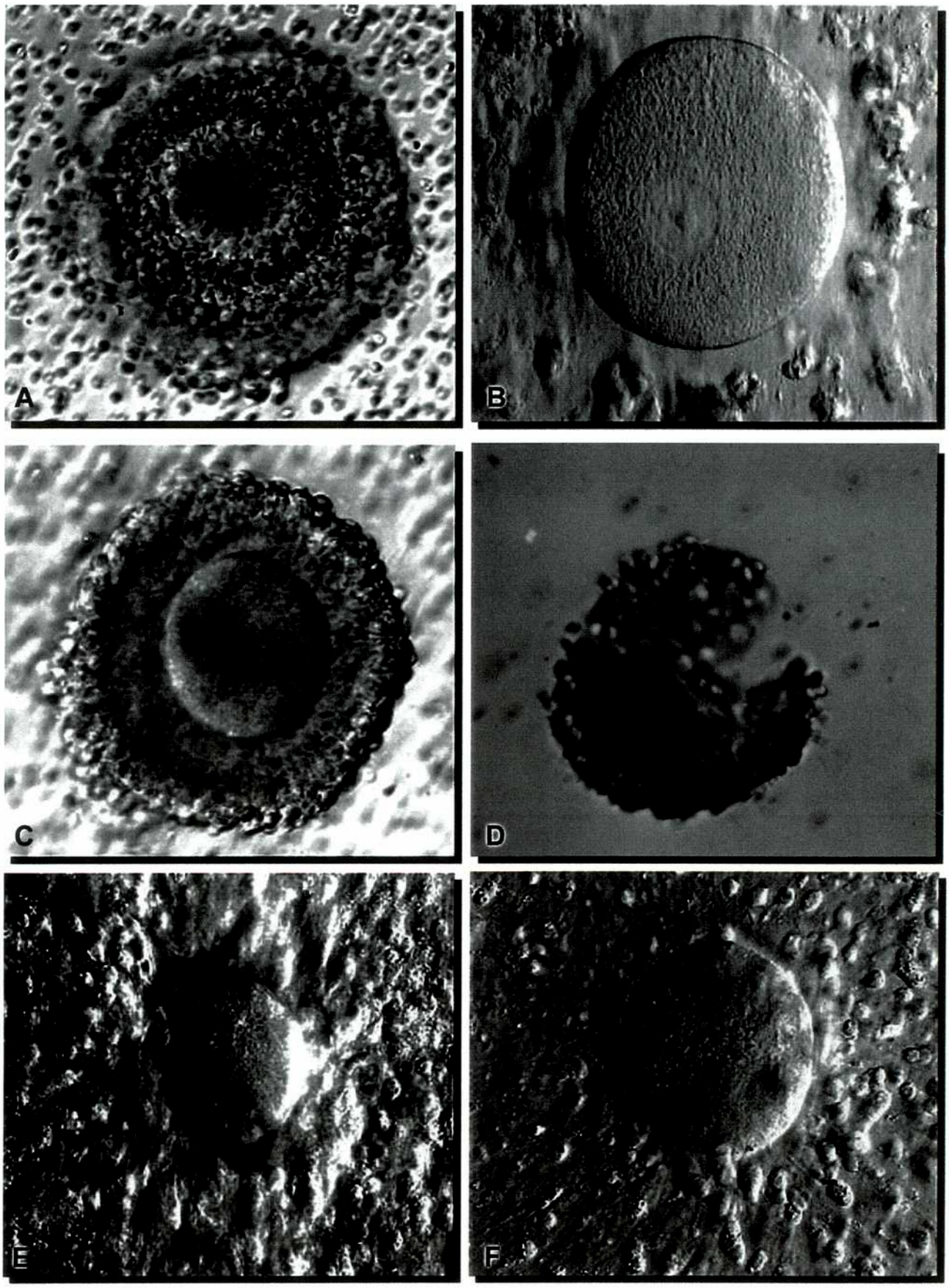
El procesamiento de los COC´s es similar al descripto para FIV hasta el momento en que fueron guardados en estufa en el interior de tubos conteniendo 1 ml de HTF-SSS. En el caso de la ICSI, los COC´s permanecen en estufa entre 2 y 4 horas, antes de ser inyectados.
Durante este período, se procede al lavado de los COC´s con el objeto de eliminar las células de la granulosa, de manera de obtener los oocitos con zona pelúcida exclusivamente. Con este objetivo, los COC´s son colocados en el interior de gotas de 35 μl de medio Hepes Human Tubal Fluid (Irvine Scientific, USA) suplementado con 1% de Bovine Serum Albumin (Sigma, USA) (HHTF-BSA) contenidas en cápsulas de 100x20 mm y luego se los sumerge en una gota que contiene la enzima hialuronidasa (Sigma, USA) (80 UI en HHTF-BSA) durante 30 segundos aproximadamente. La acción enzimática se detiene por dilución, tomando los oocitos con micropipetas especialmente construidas a partir de capilares (Hirschmann Laborgerate, Germany) y pasándolos a gotas con HHTF-BSA. La extracción de las células de la corona radiata se realiza por acción mecánica por el ascenso y descenso de los oocitos en el interior de las micropipetas.
Una vez que los oocitos quedaron libres de las células de la granulosa, se los separa en grupos de 4 y se los coloca en el interior de un hoyo correspondiente a cajas de cultivo de 4 hoyos (Nunclon, Nunc, Denmark) que contienen 0,5 ml de medio HTF-SSS en cada hoyo para luego clasificar su estado madurativo. Los oocitos obtenidos se clasifican según su estadio de maduración (Figura 8) en las siguientes categorías:

Profase I: Cúmulus oophorus escaso sin expansión o ausente
Corona radiata compacta y presencia de vesícula germinal
Metafase I: Cúmulus oophorus abundante, expandido
Corona radiata expandida, espacio perivitelino sin presencia de corpúsculo polar.
Metafase II: Cúmulus oophorus abundante, expandido
Corona radiata expandida, espacio perivitelino con presencia de cuerpo polar
Post- maduro: Corona radiata densa y oscura
Degenerado: Citoplasma oscuro y granulado
Zona Fracturada: Citoplasma y zona pelúcida rotos

La caja de 4 hoyos conteniendo los oocitos MII se coloca en estufa hasta el momento de la inyección intracitoplasmática.

Figura 8. Distintos estadios madurativos de oocitos humanos.

A y B: *Profase I:* En estos oocitos el cúmulus oophorus es escaso, sin expansión o ausente. La corona radiata es compacta y hay presencia de vesícula germinal. C: *Metafase I:* En este estadio los cúmulus oophorus son abundantes, pero sin suficiente expansión. La corona radiata es expandida y el espacio perivitelino sin presencia de corpúsculo polar. D: *Post-maduro:* Cuando los oocitos son 'sobremaduros', la corona radiata es densa y oscura. E y F: *Metafase II:* En los oocitos maduros, el cúmulus oophorus es abundante y expandido. La Corona radiata es expandida y en el espacio perivitelino se observa la presencia del primer cuerpo polar. *Fotografías tomadas en el Laboratorio de Embriología de CEGyR e Internet (www.ivf.com).*


A
B
C
D
E
F

2- PREPARACIÓN DE SEMEN

A. Evaluación inicial de la muestra de semen

La primera evaluación incluye la medición del volumen y determinación de la concentración, movilidad y morfología. El paciente debe tener una abstinencia sexual de 3-5 días. Luego de obtenida la muestra de semen, en un frasco estéril o mediante relaciones sexuales, debe ser entregada al laboratorio dentro de la hora de obtención. Se deja licuar (aproximadamente 20 minutos), se procede a evaluar el volumen seminal, consistencia, concentración y movilidad espermáticas. En los casos en que el paciente presente antecedentes de dificultad en la obtención del semen, se recomienda tener una muestra criopreservada con anterioridad al procedimiento.

Determinación de la concentración y movilidad

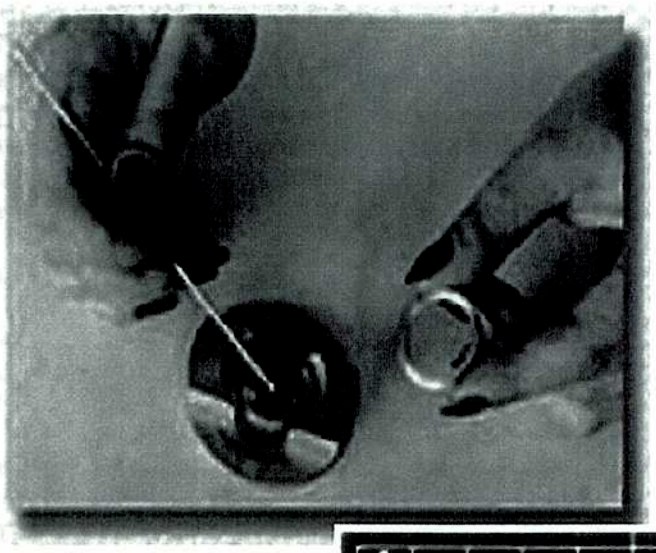
Se colocan 5 μL de semen en la Cámara de Makler (Figura 9). La muestra se evalúa con un microscopio invertido (40X) y se procede a la determinación de la concentración de espermatozoides, expresada en millones por mililitro ($n \times 10^6$/ml). La movilidad se determina como el porcentaje de espermatozoides móviles contados en la Cámara en función del total de espermatozoides presentes. Además de determinar la movilidad total, se evalúa el porcentaje de espermatozoides translativos rápidos (III); lentos (II) y móviles in situ (I).
Concentración: n x 10^6 espermatozoides /ml
Movilidad: % total (% III; % II; % I) % total = %III+ %II+ %I

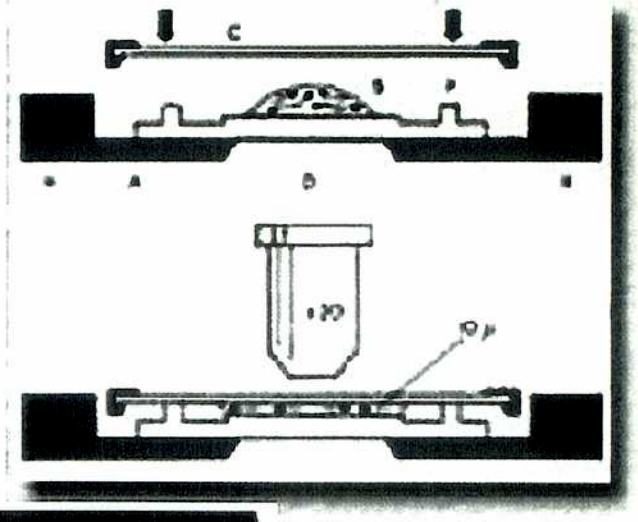
Cuando la muestra de espermatozoides presenta una distribución uniforme en la cuadrícula y cuenta al menos con 1 espermatozoide por cuadrado, se procede a calcular un promedio de espermatozoides por cuadrado usando al menos 10 cuadrados. Luego, este valor multiplicado por 10, indicará la concentración de espermatozoides en 10^6 /ml.

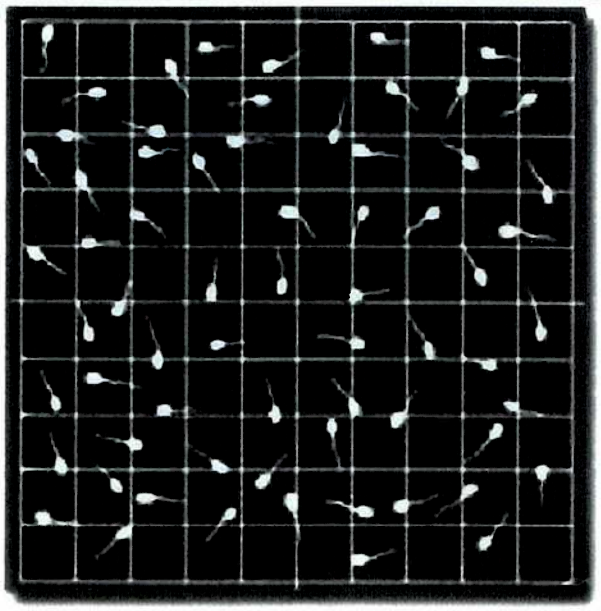
Cuando la cantidad de espermatozoides presenta una distribución comparable pero entre filas (o columnas), de la cuadrícula, se procederá a calcular el promedio de espermatozoides de 10 filas o columnas y, ese valor indicará la concentración de espermatozoides en 10^6 /ml (ejemplo: pacientes con muestras subnormales).

Figura 9. Cámara de Makler y espermatozoides en la cuadrícula.

El conteo de los espermatozoides de eyaculado se realiza en la cámara de Makler. Previo al calentamiento a 37ºC, se depositan 5 µl del semen en un soporte que se muestra a la izquierda. Posteriormente, la Cámara se cubre con una cuadrícula (derecha) antes de la visualización al microscopio en 200x. Sobre la cuadrícula se realiza el conteo y se determina la concentración de espermatozoides/ ml y la movilidad (ver texto para mayor detalle). *Tomado de Internet (www. Selfi-medical.com).*




C
A
B



En pacientes oligozoospérmicos severos, la concentración de espermatozoides es evaluada contando todos los espermatozoides presentes en la cuadrícula. Esto se realiza al menos 3 veces y así se calcula un promedio. De esta forma se obtiene la concentración de espermatozoides en 10^5/ml.

En aquellos pacientes en los que la cantidad de espermatozoides sólo alcanza para contar en toda la Cámara, se realiza el contaje en distintos campos. El resultado se indica como *n* espermatozoides cada x campos contados.
En todos los casos las muestras de semen deben ser evaluadas de la siguiente manera:

- Se debe homogeneizar la suspensión de espermatozoides antes de tomar la alícuota de 5 µL y proceder a su evaluación.

- En todos los casos la suspensión de espermatozoides debe contarse sobre la Cámara de Makler previamente calentada sobre platina térmica a 37ºC.

- Criterio de inclusión para el contaje con la Cámara de Makler: se considera dentro del cuadrado (o la cuadrícula) a aquellos espermatozoides que toquen los bordes superiores y derechos (o inferiores e izquierdos). Así, se evita contar los espermatozoides dos veces.

B. Métodos de separación

Una vez realizada la evaluación inicial, se procede a la separación de los espermatozoides móviles.

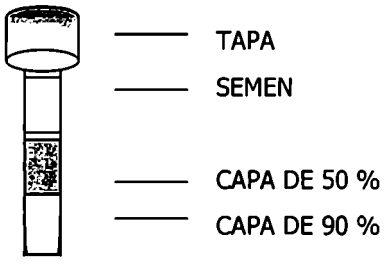
a- Migración por Swim up

Se coloca en tubos de centrífuga de 15 mL 1-1,5 mL de medio de cultivo (Medio para preparación de Gametas –GPM- o Fluido Tubario Humano –HTF- suplementado con 15 % de Suero Sintético –SSS-). Se preparan tantos tubos como sean necesarios, de forma tal de utilizar todo el semen o el volumen que se considere necesario (dependiendo de la evaluación inicial). El semen se coloca con pipeta Pasteur estéril, lentamente en el fondo del tubo, evitando mezclarlo con el medio. Debe guardarse una relación 1:1 entre semen y medio de cultivo.

Se lleva a estufa gaseada (5 % CO_2 en aire, 37°C) durante 60 minutos. Luego, con pipeta Pasteur estéril, se recupera la fracción superior (medio de cultivo), la cual contendrá a los espermatozoides que hayan 'nadado' y se coloca en un tubo nuevo de centrífuga. Se agrega 0,5-1 mL del mismo medio que se utilizó para realizar el Swim up; se centrifuga durante 5 minutos a 1600 r.p.m y, se descarta el sobrenadante con pipeta Pasteur estéril. El sedimento obtenido se resuspende en medio de cultivo y en un volumen que varía según la técnica de fecundación que se aplicará posteriormente.
Cinco µL de esta suspensión de espermatozoides móviles se colocan en la Cámara de Makler para evaluar concentración y movilidad finales.

b- Gradientes discontinuos de Percoll

Se prepara un gradiente de Percoll por cada 2,5 mL de semen a procesar. Los gradientes se preparan el día que se van a utilizar (Figura 10). Para ello se hacen diluciones (90 % y 50 %) de la solución madre de Percoll con medio de cultivo (GPM, HTF suplementado con 15 % de SSS). Cada gradiente está compuesto por 1 mL de la capa de 90% en la parte inferior y 1 mL de la capa de 50 % en la parte superior (Figura 10). El semen se coloca con pipeta estéril sobre la capa de 50 %, lenta y cuidadosamente para evitar que se mezcle.



Se centrifuga durante 20 minutos a 1600 r.p.m; se recupera el sedimento (con tip largo especial para sedimentos y pipeta automática graduada entre 50-200 µL según el sedimento que se visualiza) en un tubo de centrífuga nuevo, se le agrega 1 mL de medio de cultivo (GPM, HTF suplementado con 15 % de SSS) y, se centrifuga durante 5 minutos a 1600 r.p.m. Se descarta el sobrenadante con pipeta Pasteur estéril. Se resuspende el sedimento final en un determinado volumen de medio de cultivo según la técnica de fecundación a utilizar (ver Procedimientos).
Cinco µL de esta suspensión de espermatozoides móviles se siembran en la Cámara de Makler para evaluar concentración y movilidad finales.

Figura 10. Gradiente de Percoll.

En la fotografía se pueden visualizar las distintas capas de Percoll. La superior (más oscura) está preparada al 50% con HTF/SSS 15% (ver texto). La inferior corresponde a una dilución del 95% con HTF/SSS 15%. La muestra de semen se siembra por encima de la capa de 50%, para luego ser centrifugada para obtener una fracción seleccionada de espermatozoides. *Fotografía tomada en el Laboratorio de Embriología de CEGyR.*

c- Centrifugación a alta velocidad

Se hacen alícuotas de la muestra en tubos Eppendorf de 1,5 ml (no más de 0,5 mL de semen por tubo) y se completa con medio de cultivo (GPM, HTF suplementado con SSS al 15 %, Hepes-HTF adicionado con 1 % de Albúmina Bovina Fracción V –BSA-); se pasan los tubos por vortex; se centrifugan durante 5 minutos a 4800 r.p.m.; los sobrenadantes son descartados con pipeta Pasteur estéril; los sedimentos son recuperados en un único tubo Eppendorf resuspendiendo en un pequeño volumen de medio de cultivo (50-100 μL de acuerdo al sedimento obtenido) dependiendo de la técnica a aplicar posteriormente. Luego se evalúa la concentración y movilidad de los espermatozoides recuperados colocando 5 μL de esta suspensión en la Cámara de Makler.

C. Procesamiento de las muestras según su clasificación

a) De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), una muestra de semen normal presenta los siguientes parámetros: concentración ≥ 20 x 10^6 espermatozoides /mL, movilidad ≥ 50 % y morfología según Kruger ≥ *14 % de formas normales*. Cuando trabajamos con muestras Normales, utilizamos la Migración por Swim up o el gradiente discontinuo de Percoll como métodos de separación de forma indistinta.

- Todas las muestras de semen para realizar un **FIV** fueron siempre procesadas por esta técnica.
- En los casos de **ICSI** que presenten las siguientes características se utilizó la técnica de Swim up migración como método de separación:

Volumen:	normal
Concentración:	≥ $10x10^6$ espermatozoides/mL
Movilidad:	≥ 30% (Grado III + II)

b) En aquellas muestras de semen consideradas por la O.M.S. como Subnormales (oligozoospérmicas: < 20 x 10^6 espermatozoides/mL; astenozoospérmicas: < 50 % de formas móviles; teratozoospérmicas: < 14 % de formas normales según morfología de Kruger; o combinación de ellas) la técnica de separación que utilizamos dependió del procedimiento a realizar como se explicó anteriormente.

c) En los casos de pacientes que presentaron Criptozoospermia, procesamos la muestra de semen por centrifugación a alta velocidad. Este mismo procedimiento lo aplicamos en los

casos de Oligozoospermia severa en los cuales no se recuperan espermatozoides post Percoll.

d) Cuando se trabaja con muestras de Espermatozoides Eyaculados Criopreservadas, se las deja descongelar a temperatura ambiente. Lentamente y gota a gota, se agrega medio de cultivo en una relación 2:1, a la suspensión de espermatozoides. Se coloca en un tubo de centrífuga de 15 mL y se centrifuga a 1600 r.p.m. durante 5 minutos. El sedimento obtenido se resuspende en 1 mL de medio de cultivo (GPM, HTF con 15 % de SSS, H-HTF con 1 % de BSA) y se evalúa la concentración y movilidad en Cámara de Makler. Normalmente las muestras criopreservadas presentan baja movilidad inicial. La suspensión obtenida se siembra sobre un gradiente discontinuo de Percoll y se procede como se explicó en ese punto.
Si se trata de Espermatozoides Criopreservados provenientes de punciones (epidídimo, testículo) o de biopsias testiculares de espermatozoides provenientes de Biopsia testicular o punción de epididimo/testículo), luego de la centrifugación de 5 minutos, el sedimento obtenido se resuspende en un pequeño volumen (20-100 μL) de H-HTF suplementado con 1% BSA y se procede a su utilización.

e) En los casos en que el paciente presenta Retroeyaculación, se le indica tomar 2 cucharadas soperas de Bicarbonato de Sodio disueltas en un vaso de agua, cada 8 horas el día anterior al procedimiento; además ingerir una dieta escasa en líquidos. La noche anterior no debe casi ingerir líquido. A la mañana siguiente debe orinar y luego mantener una relación sexual o bien efectuar una masturbación. Luego, deberá orinar nuevamente y recoger esa orina en un recipiente estéril que contiene 10 mL de Buffer Fosfato Salino de Dulbecco. Se entrega al laboratorio donde se la divide en alícuotas en tubos de centrífuga de 15 mL, se centrifuga por 5 minutos a 1700 r.p.m. Los sedimentos obtenidos se resuspenden y se colocan en un único tubo con medio de cultivo según la técnica a aplicar y se evalúa concentración y movilidad final en la Cámara de Makler. Siempre que sea posible aplicar un gradiente de Percoll de al menos una capa (95%) como método de separación.

f) En pacientes discapacitados medulares o con aneyaculación, la muestra de semen es obtenida por Electroestimulación. Para ello se utiliza un electroestimulador con transductores transrectales; la muestra de semen se recolecta en un frasco estéril que contiene 5 mL de Buffer Fosfato Salino de Dulbecco; una alícuota de 5 μL es evaluada en la cámara de Makler y, la muestra es luego procesada por gradientes discontinuos de

Percoll o por centrifugación a alta velocidad según sus características de concentración y movilidad iniciales. El sedimento final es resuspendido en medio de cultivo según la técnica a aplicar y se evalúa concentración y movilidad final en la Cámara de Makler.

g) Cuando el paciente presenta Azoospermia, según se trate Obstructiva o de No Obstructiva (Secretora), la técnica de recuperación de espermatozoides aplicada varía. En los casos de azoospermia obstructiva, se utiliza Punción de Epidídimo, ya que es un buen método por el cual se recupera gran cantidad de espermatozoides y en la mayoría de los casos, un gran porcentaje de los mismos es móvil. Cuando se trata de Azoospermias secretoras, se realizan Biopsias testiculares múltiples (Figura 12).

- PUNCIÓN DE EPIDÍDIMO

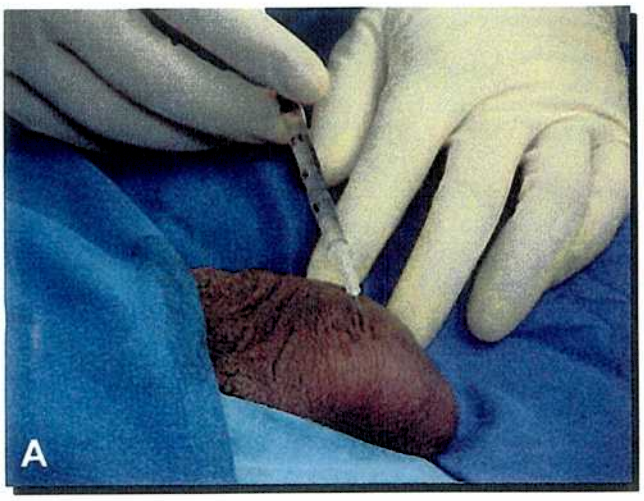
La Punción de Epidídimo se realiza con habón anestésico en piel y túnica vaginal a nivel de la cabeza del epidídimo. Luego se procede a la punción de dicha estructura con jeringa de 1 ml y aguja calibre 30 (30 G)(la jeringa contiene 0,1 mL de H-HTF suplementado con BSA al 1%). Las jeringas son enviadas al laboratorio donde se vacía el contenido de las mismas en una cápsula de 60x15 mm y luego se hace pasar a través de las agujas y jeringas una pequeña cantidad de H-HTF adicionado al 1 % con BSA. Se verifica bajo microscopio invertido la presencia de espermatozoides y la movilidad. Se toma nota del lado del epidídimo que fue punzado y las características de los espermatozoides presentes. Esta suspensión de espermatozoides se coloca con pipeta Pasteur de vidrio estéril en un tubo de centrífuga de 15 mL; se agrega 1 mL de H-HTF suplementado con BSA al 1 %; se centrifuga durante 5 minutos a 1700 r.p.m. y el sedimento obtenido se resuspende en 50-200 µL de H-HTF suplementado al 1% con BSA (dependiendo del sedimento). En el caso de no encontrar o considerar insuficiente la cantidad de espermatozoides móviles se realizan otras punciones epididimarias. Este procedimiento se puede visualizar en la Figura 11.

- BIOPSIA TESTICULAR

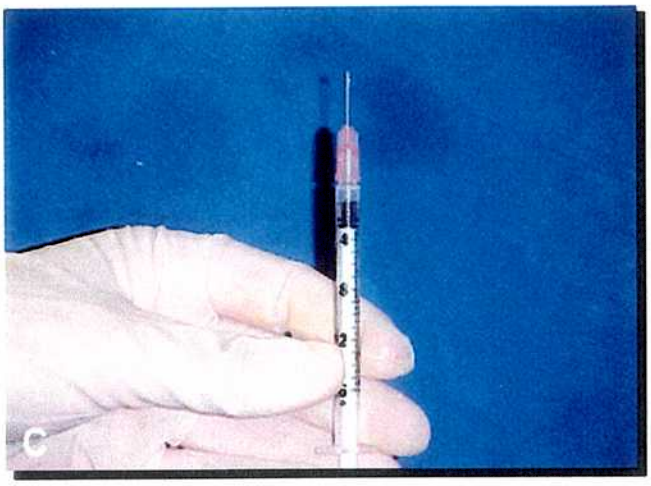
La anestesia requerida para esta intervención puede ser general, peridural o local. Una vez exteriorizados los testículos se realizan pequeñas biopsias (6 o 7 por testículo) con el objeto de cubrir la mayor parte del volumen del órgano. Las muestras se lavan en solución fisiológica (NaCl al 0,9 % estéril) e inmediatamente se colocan en un tubo de 16 mL que contiene 2 mL de H-HTF adicionado con 1% de BSA. Se envían al laboratorio donde, con la ayuda de una cápsula de 60x15 mm y dos portaobjetos estériles se disgrega el tejido. Se

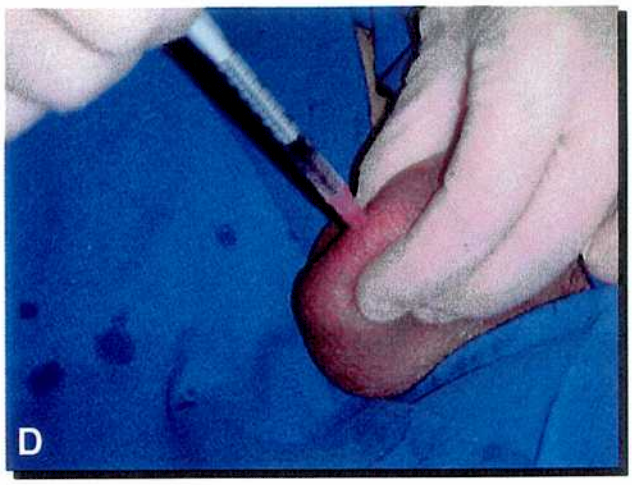
Figura 11. Secuencia de eventos durante una punción de epididimo.

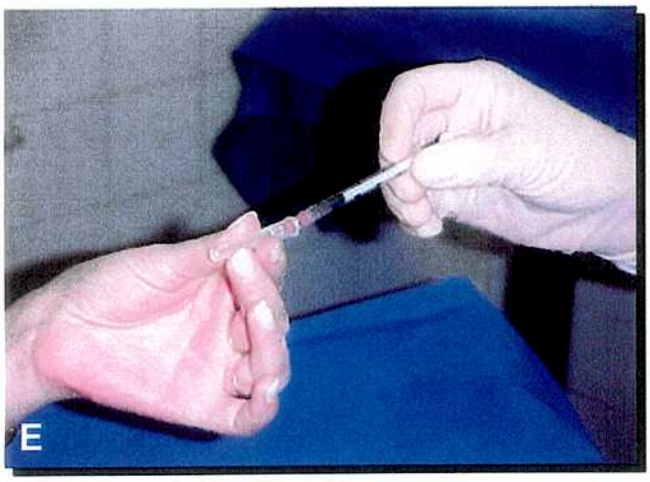
A: Anestesia en piel y túnicas vaginales en el ámbito de la cabeza de epididimo. B, C y D: Punción con jeringa de 1ml con 0,1 ml de H-HTF+BSA 1% y aguja 30G. E: Vaciado y lavado del contenido de las jeringas en el laboratorio. F: Determinación de presencia de espermatozoides bajo microscopio invertido. Posteriormente se realiza un gradiente de Percoll (50% / 95%) y se resuspende el precipitado en 100-200 µl de H-HTF+ BSA 1%. *Fotografías tomadas en el Quirófano y Laboratorio de Embriología de CEGyR.*

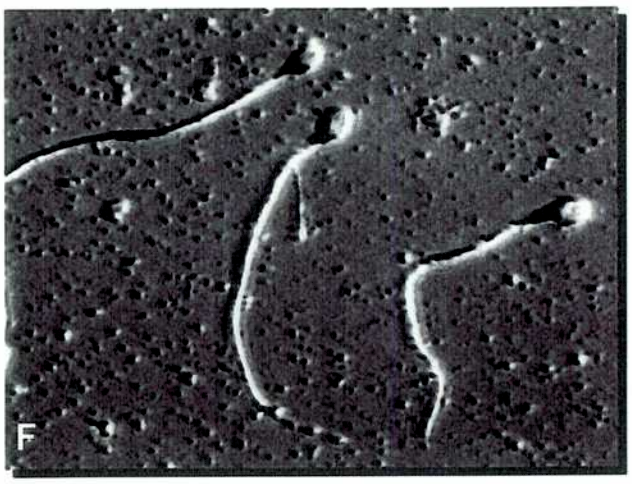

A

B


C


D


E


F

determina la presencia de espermatozoides y su movilidad en el microscopio invertido. Se toma nota del lado biopsiado y de las características de los espermatozoides presentes. Se recolecta esta suspensión con una pipeta Pasteur de vidrio estéril y se coloca en un tubo de centrífuga de 15 mL; se agrega 1 mL de H-HTF suplementado con BSA al 1 %; se centrifuga durante 5 minutos a 1700 r.p.m. y el sedimento obtenido se resuspende en 50-200 µL de H-HTF suplementado al 1% con BSA (dependiendo del sedimento obtenido). En el caso de no encontrar o considerar insuficiente la cantidad de espermatozoides móviles se realizan nuevas biopsias y se procede del mismo modo. Este procedimiento se puede visualizar en la Figura 12.

I) En el caso de trabajar con espermatozoides inmóviles; ya sea provenientes de punción o biopsia testicular, muestras descongeladas o espermatozoides provenientes de muestras de semen fresco que luego de unas horas de procesadas perdieron la movilidad, se utiliza una metilxantina, como la Pentoxifilina, al 0,5 % en Buffer Fosfato Salino (3,5 mM) (ver Preparación de medios de cultivo). Se lleva la muestra a un volumen final de 0,5-1 mL con el mismo medio en el cual se halla resuspendida. Se le agrega (en tubo de 15 mL de centrífuga) luego, en una relación 1:1, la solución de Pentoxifilina preparada en el momento. Se incuba durante 30 minutos en estufa gaseada (5 % CO_2 en aire, 37°C). Luego de finalizada la incubación, se agrega 1 mL del medio de cultivo que se está utilizando y se centrifuga durante 5 minutos a 1600 r.p.m.; el sedimento obtenido se resuspende en 50-200 µL de medio de cultivo correspondiente.

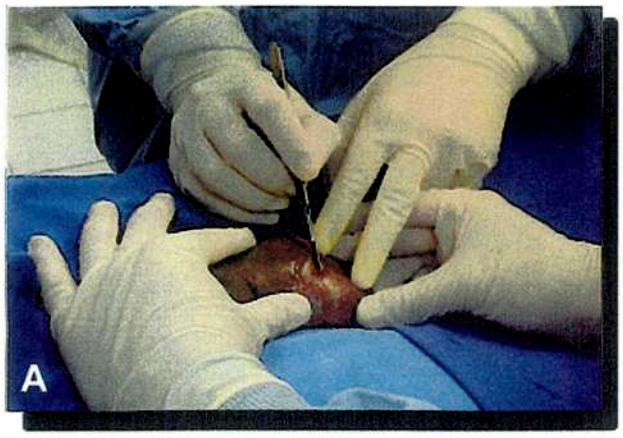
D. Procedimientos

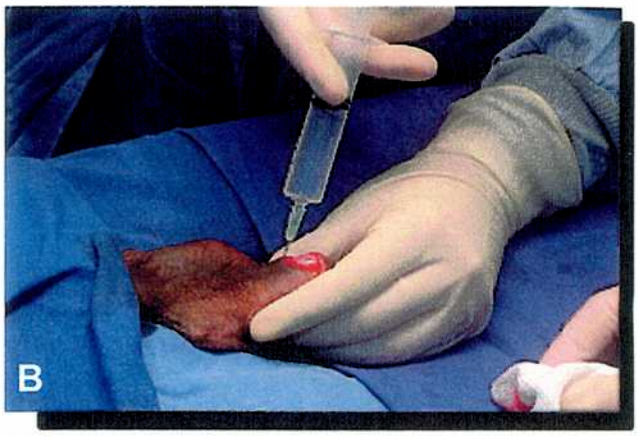
a) Fecundación In Vitro (FIV)

Luego de procesada la muestra de semen, se resuspende el sedimento final en 0,1 mL de HTF suplementado con 15 % de SSS.
El volumen final de medio de cultivo depende sobre todo de la cantidad recuperada que se visualiza por el sedimento observado luego de la centrifugación post- lavado del Percoll/ Swim up. El fin de esto es resuspender en una cantidad de medio tal que tengamos > $10x10^6$espermatozoides móviles / mL. La concentración ideal ($30\text{-}100x10^6$/mL) es aquella que nos permita luego inseminar con un volumen de 5-15 µL (conteniendo 200.000 espermatozoides móviles Grado III).

Figura 12. Secuencia de eventos durante una biopsia de testículo.

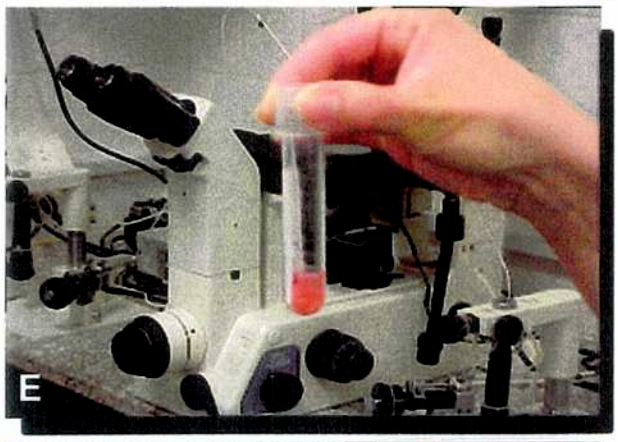
A, B, C y D: El procedimiento se realiza bajo anestesia general, peridural o local. Se procede a la realización de seis o diez pequeñas incisiones por testículo. E: Posteriormente se lava en solución fisiológica y se transporta al laboratorio en H-HTF+BSA 1%. F: Luego se disgrega del tejido en laboratorio con portaobjetos estériles y se determina la presencia de espermatozoides bajo microscopio invertido. G y H: Posterior a la centrifugación del tejido a 1500 r.p.m. en H-HTF +BSA 1%, se resuspende el precipitado en 50-200 µl de H-HTF +BSA 1% y se visualiza en el microscopio. En caso de no encontrar espermatozoides se realizan nuevas biopsias y se procede del mismo modo. *Fotografías tomadas en el Quirófano y Laboratorio de Embriología de CEGyR.*


A


B

C

D


E

G

H

Se requiere al menos una recuperación total de $1,5x10^6$ espermatozoides móviles Grado III en 1 mL de medio de cultivo para poder aplicar la técnica de FIV además de un Kruger ≥ 14 % de formas normales.

b) Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI)

Si la muestra fue procesada por gradiente discontinuo de Percoll, el sedimento obtenido post-Percoll se coloca en un tubo Eppendorf, se agrega HTF suplementado al 1 % de BSA hasta enrasar el tubo Eppendorf y se lo centrifuga durante 5 minutos a 4800 r.p.m. Se descarta el sobrenadante y, el sedimento obtenido, se resuspende en 20-200 µl de H-HTF suplementado al 1 % con BSA.

El criterio para decidir la cantidad final de medio de cultivo es similar pero inverso al utilizado para un FIV. En esta técnica se necesita tener a los espermatozoides móviles (sea cual sea el Grado de movilidad) lo suficientemente diluidos ($1x10^5$-$1x10^6$ espermatozoides móviles /ml) de manera tal de poder trabajar de forma cómoda al momento de realizar la 'captura' de los espermatozoides móviles en las microgotas de 5 µL de H-HTF suplementado al 1 % de BSA.

Si la muestra fue procesada por centrifugación a alta velocidad, se descartan los sobrenadantes y se resuspenden los sedimentos, en un único tubo Eppendorf, en 20-200 µl de H-HTF suplementado al 1 % con BSA, utilizando el criterio explicado más arriba. En estos casos particulares (Criptozoospermia por ejemplo), al no haberse utilizado el gradiente de Percoll, el sedimento va a contener además de los posibles espermatozoides, células de descamación, células de la progenie, células de la línea blanca si existieran, etc.; por esto se sugiere no resuspender en muy poco volumen ya que la búsqueda de los espermatozoides se vería dificultada.

Luego del Percoll de este tipo de semenes, usualmente se recupera un buen sedimento, de manera que puede ser lavado en un tubo de centrífuga de 15 mL con 1 mL de H-HTF suplementado al 1 % con BSA y luego resuspender el sedimento obtenido con el criterio ya explicado. Suele, en este caso, ser necesario resuspender el sedimento final hasta en 2 mL de H-HTF suplementado al 1 % con BSA para no superar $1x10^6$ espermatozoides móviles/mL.

E. Soluciones y medios de cultivo

a. Solución Madre de Percoll.

La solución madre de Percoll se prepara en una relación 9 de Percoll y 1 de HAM F-10 (10 X); se filtra con filtro de 0,22 μm y se coloca en tubos de 16 mL en estufa gaseada (5 % CO_2 en aire, 37°C) al menos 4 horas antes de ser utilizada.

b. HAM F-10 (10X).

Se adiciona a cada 100 mL de HAM F-10 (10X) líquido, 2,1 g de Bicarbonato de Sodio, 0,075 g de Estreptomicina y 0,075 g de Penicilina. Se agita hasta total disolución, se filtra con bomba de vacío y con poro de 0,22 μm. Se hacen alícuotas de 10 mL en tubos de 16 mL y se conservan a –20 °C (congelador). El HAM F-10 (10X) una vez descongelado, se conserva a 4 °C (heladera) durante su uso.

c. HTF suplementado con 15 % de Substituto de Suero Sintético (SSS)

Se adiciona el SSS a la cantidad de HTF que se utilizará en una proporción del 15 %. Luego se filtra con poro de 0,22 μm; se fracciona en tubos de 16 mL y se coloca en estufa gaseada (5 % CO_2 en aire, 37°C) al menos 4 horas antes de ser utilizado.

d. HTF con Hepes (H-HTF) suplementado al 1 % con Albúmina Sérica Bovina (BSA)

Se adiciona el H-HTF a la albúmina y se deja disolver lentamente. Luego se filtra con poro de 0,22 μm; se coloca en tubos de 16 mL y se lleva a estufa gaseada (5 % CO_2 en aire, 37°C).

e. GPM

No requiere ser gaseado antes de su utilización. Sólo debe estar a 37°C. Se procede a filtrar con poro de 0,22 μm; se coloca en tubos de 16 mL y en estufa gaseada (5 % CO_2 en aire, 37°C).

f. Buffer Fosfato Salino

Se prepara con 100 mL de agua bidestilada autoclavada. Se le agregan 0,718 g de Cloruro de Sodio, 0,037 g de Cloruro de Potasio, 0,025 g de Sulfato de Magnesio y 0,448 g de TRIS; se deja disolver bien y se filtra con poro de 0,22 μm. Se hacen alícuotas de 2,5 mL en tubos de 6 mL y se conservan a -20 ° C (congelador).

g. Pentoxifilina al 0,5 %

Se prepara en el momento de ser utilizada. Pesar 0,01 g de Pentoxifilina y agregarle 2 mL del Buffer Fosfato previamente descongelado. Se deja disolver y se filtra con poro de 0,22 µm.

3. FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV)

Una vez procesada la muestra de semen y obtenidos los oocitos de manera ya descripta, se deja reposar la muestra de semen a temperatura ambiente y los oocitos en estufa a 37°C, 5 % CO_2 en aire hasta el momento de ser inseminados luego de aproximadamente cinco horas de la captación oocitaria. En ese momento los tubos que contienen los COC´s se sacan de la estufa, y, bajo lupa y platina térmica, se los separa empleando una pipeta Pasteur en grupos de 4 y se los coloca en el interior de un hoyo correspondiente a cajas de cultivo de 4 hoyos (Nunclon, Nunc, Denmark) que contienen 0,5 ml de medio HTF-SSS en cada hoyo. La inseminación se realiza agregando el volumen calculado de semen ya preparado a cada hoyo. La caja de 4 hoyos conteniendo los COC´s inseminados se coloca en estufa, para revisar fecundación entre las 16 y 18 horas posteriores.

4. INYECCIÓN INTRACITOPLÁSMICA DE ESPERMATOZOIDES (ICSI)

Previamente a la ICSI, se prepara una cápsula en la que se colocan los oocitos a ser inyectados y en donde también se capturan los espermatozoides que serán activados y luego inyectados. Para ello, se arma una cápsula de 50x9 mm (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) que contiene 2 gotas de 5 µl con HHTF-BSA en la que se colocarán los oocitos a inyectar, 2 gotas de 5 µl de polivinilpirrolodona (PVP) (ICSI-100, Scandinavian IVF Science AB, Gothemburg) en la que se colocarán los espermatozoides seleccionados para ser inyectados y en donde se los activa, y 21 gotas que contienen 3 µl de HHTF-BSA y 2 µl de muestra de semen previamente preparada, de las que se tomarán los espermatozoides para ser inyectados. Todas las gotas se encuentran sumergidas en aceite mineral (Sigma, USA).
La captura de los espermatozoides, la activación de los mismos y la inyección intracitoplasmática se realiza por medio de un micromanipulador (Narishige, Nikon Corporation, Japan) en microscopio invertido con platina térmica.
Para la captura de un espermatozoide seleccionado, se utiliza una micropipeta (ICSI Micropipets, Humagen, Charlottesville, VA, USA). Una vez tomado, el espermatozoide es llevado a la gota que contiene el PVP, en donde se lo coloca y con un fino movimiento de la micropipeta sobre la cola del mismo, se procede a la activación. Mientras tanto, con la otra

micropipeta (Holding Micropipets, Humagen, Charlottesville, VA, USA), en la gota correspondiente, se sujeta uno de los oocitos a ser inyectado. En este momento, se procede a la toma del espermatozoide activado con la micropipeta y se lo lleva hacia la gota en la que se encuentra el oocito a ser inyectado. Con un movimiento rápido se procede a la inyección del espermatozoide en el interior del oocito. Se repiten estos pasos con cada uno de los oocitos a ser inyectados.

Concluida la inyección de todos los oocitos, se los coloca en cápsulas de 35x10 mm (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) que contienen gotas de 35 μl de HTF-SSS sumergidas en aceite mineral. En cada gota se colocan 4 oocitos inyectados. Las cajas se llevan a estufa y se revisa la fecundación de 16 a 20 horas después de la inyección.

Este procedimiento se puede visualizar en la Figura 13.

III. INMUNOCITOQUIMICA

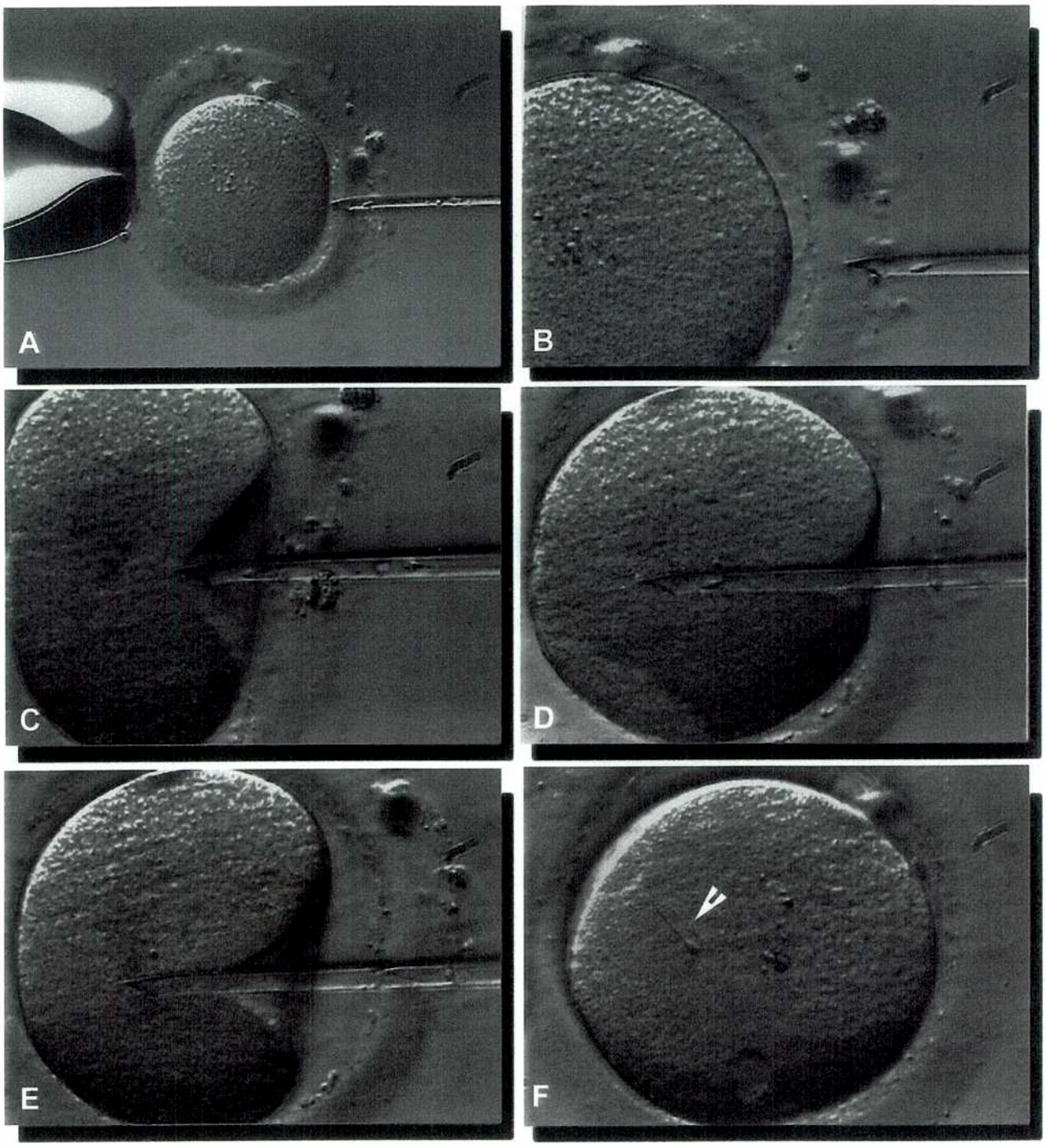
1- PROCEDIMIENTO

El material estudiado se procesó para inmunofluorescencia (directa o indirecta), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de β tubulinas y α tubulinas acetiladas (detección de la cola del espermatozoide). Los oocitos estudiados se procesaron según el protocolo descripto por Messinger y col. (1991) con algunas modificaciones. Luego del estudio a través de microscopio óptico en el que se recopiló información morfológica de cada oocito a estudiar (e.g, cantidad de cuerpos polares, estado del citoplasma, zona pelúcida, etc.). El primer paso consistió en la remoción de la zona pelúcida por medio de la incubación de los oocitos durante unos segundos en solución ácida de Tyrodes. Posteriormente, se permeabilizaron y fijaron los oocitos por 20 min. a 37ºC en un medio de estabilización de microtúbulos {[microtubule stabilizing buffer (MSB)] , 0,1 M de Pipes, 5 mM $MgCl_2$ 6 H_2O, 2,5 mM de etilen glicol-bis [β- amino etil eter] – N,N,N´,N´- ácido tetracetico (EGTA), pH 7.0} que contiene 2% de formaldehído, 0,5% de Tritón X-100 y 1μM de Taxol. Con el fin de bloquear sitios de unión inespecíficos, el material fue incubado en una solución bloqueante (2% de albúmina sérica bovina [BSA], 2% de leche en polvo, 0,1 M de glicina y 0,01% de Tritón X-100 en PBS), por una hora a temperatura ambiente.

Para visualizar la cola del espermatozoide, se incubó el material con una dilución 1:100 de anticuerpos monoclonales anti α tubulinas acetiladas de ratón, durante toda la noche a 4ºC en PBS con 0,1% BSA y 0,02% de acida sódica (PBS + acida sódica). Los oocitos fueron luego lavados varias veces a temperatura ambiente en la solución de bloqueo e incubados con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Figura 13. Secuencia de eventos durante un ICSI

A: Hacia la izquierda se puede visualizar la pipeta de sostén que mantendrá al oocito en la posición adecuada para ser inyectado. El oocito en metafase II es mantenido con su cuerpo polar en posición horaria 12 o 6. Hacia la derecha se observa la pipeta de inyección con el espermatozoide a inyectar en su interior en posición horaria 3. B: En detalle se observa la pipeta de inyección aproximándose a la zona pelúcida. C: La inyección espermática comienza manteniendo la pipeta derecha para tratar de atravesar la membrana plasmática del oocito. D: Una vez en el interior del oocito se procede a la aspiración del citoplasma para lograr la completa penetración del espermatozoide. E: La aspiración se completa cuando ocurre la ruptura definitiva de la membrana plasmática. Al finalizar la inyección, la pipeta de inyección se retira a través del surco de inyección para finalmente dejar depositado al espermatozoide en el interior del oocito. F: El espermatozoide queda depositado en el interior del oocito (cabeza de flecha) en donde comenzará a generar los primeros eventos de la fecundación. Se puede visualizar que el surco de inyección desaparece a los pocos segundos. Magnificación en A: 40 x, B, C, D, E y F: 100x. *Fotografías tomadas por A. Valcarcel en el Laboratorio de Embriología de CEGyR.*


A
B
C
D
E
F

Con el fin de visualizar el huso meiótico y citoesqueleto, se incubaron los oocitos con anticuerpos monoclonales anti β tubulinas de ratón acoplado con Cy3, durante una hora a 37ºC. Seguidamente, los oocitos fueron lavados en PBS + acida sódica y el estado del material genético se verificó por tinción con 1 μg/ml de Hoescht 33258 (azul) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se analizó por microscopía óptica (UV).

Las fotografías fueron tomadas con una máquina OLYMPUS OM-1, y se utilizó película color Kodak Ektakrome P1600 ASA (fluorescencia) o película blanco y negro AGFA 25 ASA (luz transmitida), para tinciones convencionales (no fluorescentes). El material fotográfico se procesó por computación a través de Adobe Photoshop 5,0.

2- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

A. SOLUCIÓN ESTABILIZADORA DE MICROTÚBULOS (MICROTUBLE STABILIZING BUFFER, MSB)

Solución I (500 ml)

Medir 400 ml de agua ultra pura y agregar:
- 15,12 g Pipes (0,1M Pipes)

Medir el pH y ajustarlo a 7 con NaOH 10N, el buffer será solución cuando llegue a pH 7.

Luego agregar:
- 0,5 g $MgCl_2$ 6 H_2O (5 mM $MgCl_2$ 6 H_2O)
- 0,48 g EGTA (2,5 mM EGTA)

Agregar agua ultra pura hasta alcanzar 500 ml, filtrar con filtro de 0,2 μm y alicuotar en 100 ml. Guardar en heladera a 4º C.

Solución II

Medir 10 ml de la Solución I y agregar:
- 0,67 ml de formalina 37% (2,0% formaldehído)
- 62,5 μl Tritón X-100 (0,5% Tritón X-100)
- 125 μl de la solución stock de Taxol (1 μM de Taxol)

Luego agregar 1,64 ml de la Solución I

B. SOLUCIÓN DE LAVADO Y BLOQUEO (WASHING/ BLOCKING SOLUTION)

Medir 17,5 ml de PBS y luego agregar:

- 0,5 g BSA (2% BSA)
- 0,5 g leche en polvo descremada (2% leche descremada)
- 0,5 ml suero normal de cabra (2% suero normal de cabra)
- 0,1875 g glicina (0,1M glicina)
- 2,5 µl Tritón X-100 (0,01% Tritón X-100)

Luego agregar 7,5 ml de PBS.

C. SOLUCIÓN PARA ANTICUERPOS

Medir 25 ml de PBS y agregar:

- 0,025 g BSA (0,1% BSA)
- 0,005 g NaN_3 (0,02% acida sódica)

D. SOLUCIÓN STOCK DE TAXOL

Se agrega 1 ml de DMSO a 5 mg de Taxol. Luego se toman 17 µl de esta solución y se lo lleva a 1 ml con DMSO. Se puede conservar en heladera por tiempo prolongado.

IV. ANÁLISIS CROMOSÓMICO

1- PROCEDIMIENTO

El análisis cromosómico para la detección de activaciones abortivas se realizó siguiendo la técnica de Tarkowski (1966). Brevemente, los oocitos se incubaron en solución hipotónica de citrato de sodio al 1%, durante algunos minutos hasta lograr adelgazamiento de la zona pelúcida y expansión del citoplasma. Posteriormente, se colocó el material sobre un portaobjetos sobre el cual se depositó una gota fría (~20µl) de Metanol: Ac. Acético en una relación 3:1.

Los preparados se secaron al aire, y colorearon con una solución de Giemsa al 4% durante ~5 minutos y se analizaron al microscopio bajo aceite de inmersión.

2- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

SOLUCIÓN DE GIEMSA (4%)

Medir 96 ml de fosfato de potasio monobásico (3,4 g/l) y luego agregar 4 ml de Solución de Giemsa.

Apéndice

REACTIVOS UTILIZADOS

ANTICUERPOS PRIMARIOS

- Anti β tubulina-Cy3 (cabra) (Ratón, IgG1) **C 4585** SIGMA Immunochemicals

- Anti α tubulina Acetilada (monoclonal, clone Nº 6-11 B-1)(Ratón, IgG2b) **T 6793** SIGMA Immunochemicals

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

- Anti Mouse IgG (Fc Specific) FITC (cabra) **F 4143** SIGMA Immunochemicals

DROGAS Y MEDIOS DE CULTIVO

- Aceite de inmersión OLYMPUS
- Acido Acético (MERCK, 1.00063)
- Acido Clorídrico (J. T. Baker 9535-05)
- Albúmina Sérica Bovina fracción V, BSA (SIGMA A-4503)
  Acida Sódica (SIGMA S- 8032)
  Bicarbonato de Sodio (SIGMA S-5761)
  Buffer Fosfato Salino (ver en Preparación de medios de cultivo)
- Citrato de Sodio (SIGMA S-4641)
  Cloruro de Magnesio Hexahidratado (SIGMA M-2670)
- Cloruro de Potasio (MERCK, pro-análisis)
  Cloruro de Sodio (SIGMA S-5886)
  Dimetilsulfóxido (SIGMA D-2650)
  Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (GIBCO, Catálogo 14040-117)
  EGTA (SIGMA E- 3889)
  Estreptomicina (SIGMA S-6501)
- Formaldehído (37% solution) Formalin (SIGMA F-1635)
  Freezing Medium Test Yolk Buffer (Irvine Scientific, Catálogo 9971)

Gamete Preparation Medium, GPM, (Serono)

Glicina (SIGMA G-7403)

HAM F-10 10X (GIBCO, Catálogo 11955-036)

Hepes-Human Tubal Fluid, H-HTF (Irvine Scientific, Catálogo 9963)

Hialuronidasa (SIGMA H-3106)

Hidróxido de Sodio (NEDRA, 7203)

Hoescht 33258 (SIGMA B-2883)

- Human Tubal Fluid, HTF (Irvine Scientific, Catálogo 9962)

L (+) Acido Láctico (SIGMA L-2000)

Metanol (MERCK, 1.15827)

PBS (SIGMA P-3813)

Penicilina-G (SIGMA PEN-NA, sodium salt, 25.000.000 unidades)

Pentoxifilina (SIGMA, P-1784)

Percoll (SIGMA P-1640)

Pipes (rango de pH 6,1- 7,5) (SIGMA P- 8203)

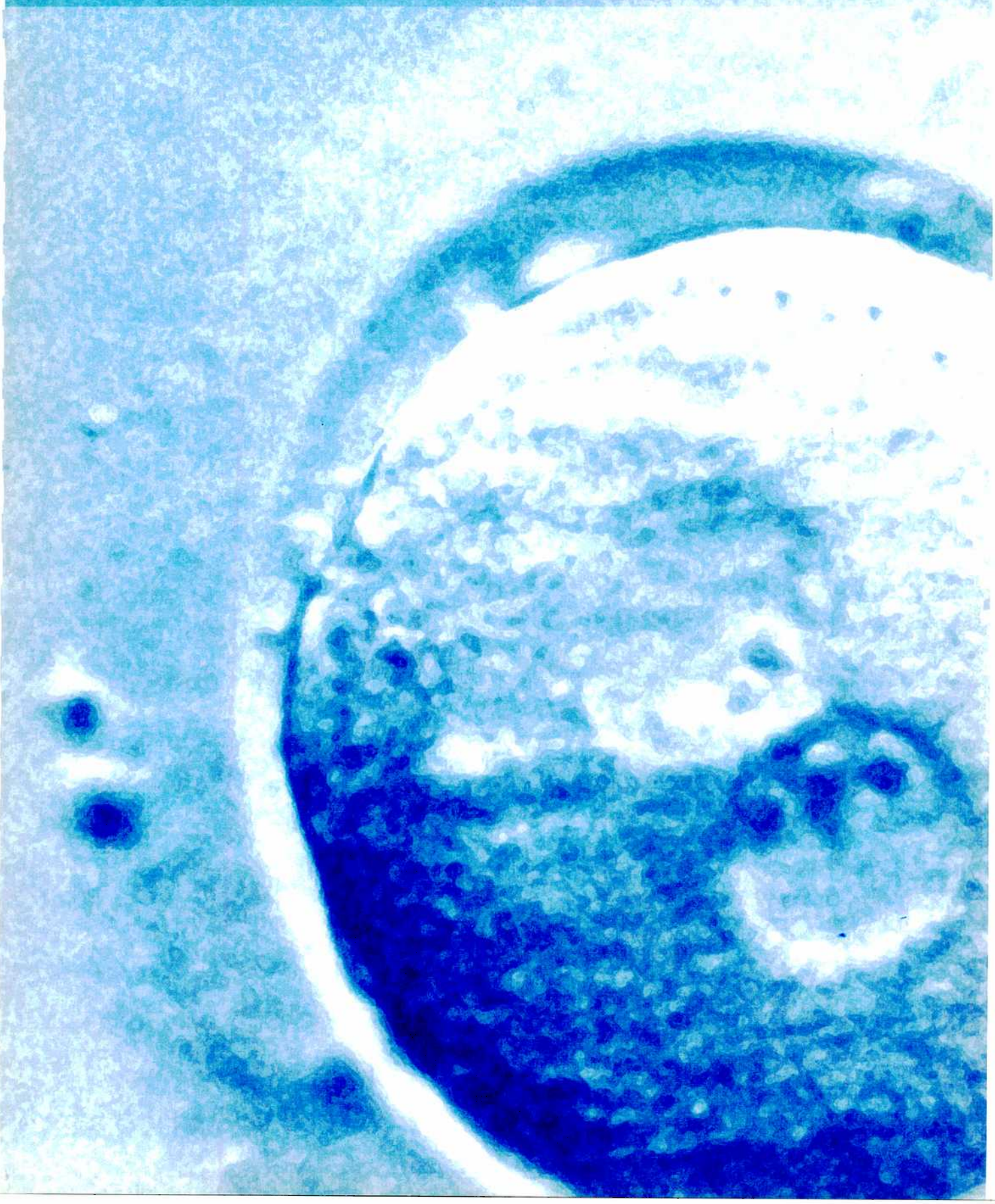
- Solución Acida de Tirodes (SIGMA T-1788)
- Solución de Giemsa (MERCK, 1.09204.1000)
- Substituto de Suero Sintético, SSS (Irvine Scientific, Catálogo 99193)
- Suero Normal de cabra (SIGMA S- 6898)

Sulfato de Magnesio (SIGMA M-2643)

- Taxol (Paclitaxel de *Taxus Yannanensis*) (SIGMA T- 1912)
- TRIS (MERCK, pro-análisis)

Tritón X-100 (SIGMA T-9284)

Resultados



CAPITULO I: FALLAS DE FECUNDACIÓN

1. DESCRIPCIÓN DE LAS CATEGORÍAS HALLADAS

a) Ausencia de penetración o inyección "fallida" del espermatozoide

b) Falla total de activación del oocito, con o sin condensación prematura de cromosomas

c) Activación abortiva

d) Subnucleación, detención en estadio de pronúcleos o en singamia

e) Detención en metafase de la primera división mitótica del cigoto

f) Otros

2. FRECUENCIAS HALLADAS EN CADA TÉCNICA

A. INMUNOFLUORESCENCIA
- FIV
- ICSI

B. ANÁLISIS CROMOSÓMICO
- FIV
- ICSI

CAPITULO II: FECUNDACIÓN ANORMAL

1. DESCRIPCIÓN DE LAS CATEGORÍAS HALLADAS

a) Distribución de tubulinas

b) Cigotos monopronucleados

c) Cigotos multipronucleados

d) Cigotos subnucleados

2. FRECUENCIAS HALLADAS EN FIV E ICSI

- Cigotos monopronucleados
- Cigotos multipronucleados
- Cigotos subnucleados

CAPÍTULO I
FALLAS DE FECUNDACIÓN

Previo al procesamiento de inmunofluorescencia, se estudiaron los oocitos que no mostraron pronúcleos por microscopía de contraste de fase de modo de obtener información acerca del estado del citoplasma (homogeneidad, granulosidad, tamaño de espacio perivitelino y color), número de cuerpos polares y presencia de fragmentos. También se incluyeron oocitos que habían detenido su fecundación en el estadio de dos pronúcleos. Se consideró oocito no fecundado a aquel en el que no se visualiza la aparición de pronúcleos bajo microscopio de luz trasmitida (1000x) y a aquellos en los que ocurrió el desarrollo de pronúcleos pero no culminaron con el proceso de fecundación luego de FIV o ICSI.
El estudio de los oocitos por microscopía de contraste de fase previo al procesamiento para inmunofluorescencia o citogenética, permitió obtener información adicional acerca de las posibles causas de falla de fecundación.

Inmunofluorescencia. El número total de oocitos visualizados con microscopio de luz transmitida y estudiados por inmunofluorescencia fue de **626**, provenientes de 149 pacientes que presentaron oocitos 'no fecundados' luego de la realización de FIV e ICSI. De los 626 oocitos, 594 (94,9%) fueron analizables por inmunofluorescencia, 265 luego de la realización de FIV y 329 luego de ICSI.

Citogenética. El número total de oocitos sin desarrollo de pronúcleos y con la expulsión de dos cuerpos polares visualizados con microscopio de luz transmitida y estudiados con la Técnica de Tarkowski fue de **189** luego de la realización de FIV e ICSI en 82 pacientes. Del total, 135 (71,4%) fueron informativos, 61 provenientes de FIV y 74 de ICSI.

A partir de los resultados obtenidos, se pudo establecer la existencia de distintos niveles de detención del desarrollo en las fases iniciales del proceso de fecundación.
A continuación se describen los distintos estadios hallados luego de cada técnica de Reproducción Asistida (RA). Las categorías descriptas se hallaron tanto en oocitos sometidos a FIV como ICSI, aunque las frecuencias de cada categoría variaron según la técnica de RA utilizada.

1. DESCRIPCIÓN CUALITATIVA DE LAS CATEGORÍAS HALLADAS

Cada uno de los estadios descriptos se encuentra representado en el Esquema 1 y en las respectivas tablas.

a) Ausencia de penetración o inyección "fallida" del espermatozoide

Este estadio se evidenció por la *ausencia* de material genético paterno y de flagelo espermático dentro del citoplasma del oocito. En estos casos sólo se pudo observar la presencia de la placa metafásica del oocito y en algunos casos también el primer cuerpo polar si es que no había sido removido luego del tratamiento con solución ácida de Tyrodes. El citoplasma del oocito se visualiza normalmente homogéneo con respecto a la distribución de β tubulinas (uniformes, sin evidencias de alteración de microtúbulos). Ejemplos de esta situación están representados en la Figura 14.

b) Fallas total de activación del oocito, con o sin condensación prematura de cromosomas

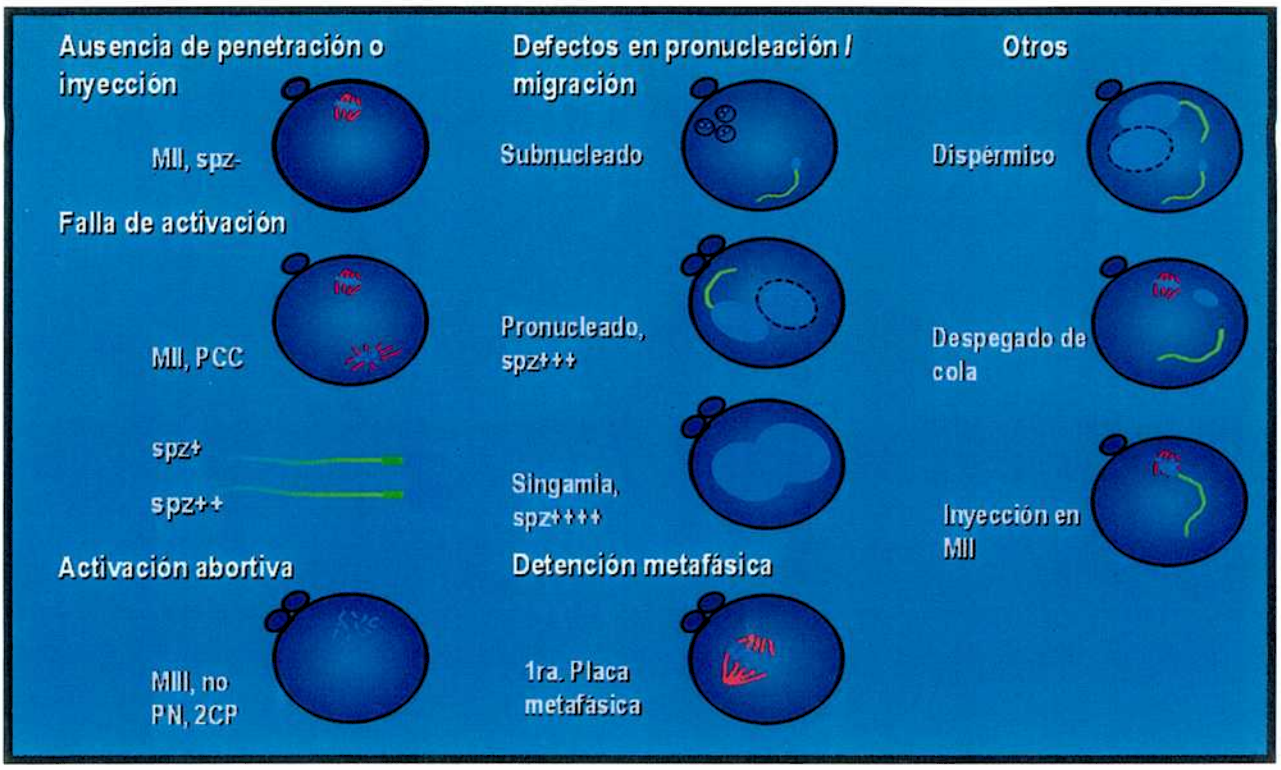
La presencia de *falla total de activación* oocitaria se caracterizó por la ausencia de expulsión del segundo cuerpo polar y la presencia intacta de la placa metafásica de la segunda meiosis del oocito. Conjuntamente con esta situación, se pudo evidenciar la presencia de material genético paterno y el flagelo del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito. En cuanto al estado de condensación de la cromatina del espermatozoide se observaron dos situaciones: (i) presencia de cromosomas paternos rodeados por microtúbulos, situación que se denomina *condensación prematura de cromosomas* (PCC) (Figura 15A), (ii) presencia de un *espermatozoide con distintos grados de condensación del material nuclear* desde "intacto" (mayor grado de condensación de la cromatina del espermatozoide, consecuencia de una falla de activación espermática) a descondensado en distintos grados. La evidencia de este tipo de falla de fecundación se representa en las Figuras 15B y C.

c) Activación abortiva

Metafase III: La presencia de este tipo de falla de fecundación se manifiesta morfológicamente por la expulsión de un segundo corpúsculo polar sin la formación de pronúcleo/ s. El estudio por inmunofluorescencia nos dio una pauta de que este tipo de categoría podría estar presente en humanos pero para poder confirmar esta sospecha fue necesario poner en práctica la técnica de Tarkowski (1966). En la

Esquema 1. Representación esquemática de los distintos estadios de falla de fecundación.

En el esquema se representan seis estadios de falla de fecundación visualizados luego del tratamiento por inmunofluorescencia y citogenético. Las categorías muestran las distintas estructuras celulares halladas con los mismos colores que luego del tratamiento por inmunofluorescencia. El huso meiótico está representado en rojo (β- tubulinas), el ADN en azul (Hoescht) y el flagelo del espermatozoide en verde (α tubulina acetilada). MII: Metafase II. Spz.-: Espermatozoide ausente, Spz.+: Espermatozoide no descondensado, Spz.++: Espermatozoide ligeramente descondensado, Spz. +++: Espermatozoide muy descondensado, Spz. ++: Espermatozoide totalmente descondensado, PCC: Condensación Prematura de Cromosomas (Premature Cromosome Condensation). PN: Pronúcleo. *Realización: Lic. Vanesa Rawe*


Ausencia de penetración o inyección
MII, spz-
Falla de activación
MII, PCC
spz+
spz++
Activación abortiva
MIII, no PN, 2CP
Defectos en pronucleación / migración
Subnucleado
Pronucleado, spz+++
Singamia, spz++++
Detención metafásica
1ra. Placa metafásica
Otros
Dispérmico
Despegado de cola
Inyección en MII

activación abortiva (Kubiak, 1989), el grupo haploide de cromosomas maternos producto de la finalización de la meiosis II, vuelve a condensarse y alinearse en una nueva placa metafásica denominada Metafase III (MIII), cuya característica esencial es la presencia de cromosomas con una sola cromátide. Las cromátides hermanas se expulsan en el cuerpo polar (Figura 16B).

Núcleo Reticular: Esta situación se puso en evidencia luego del estudio citogenético de los oocitos que no desarrollaron pronúcleos y habían expulsado dos cuerpos polares. La formación de un núcleo pequeño, redondo y con cromatina en forma reticular fue la característica que identificó a este grupo particular.

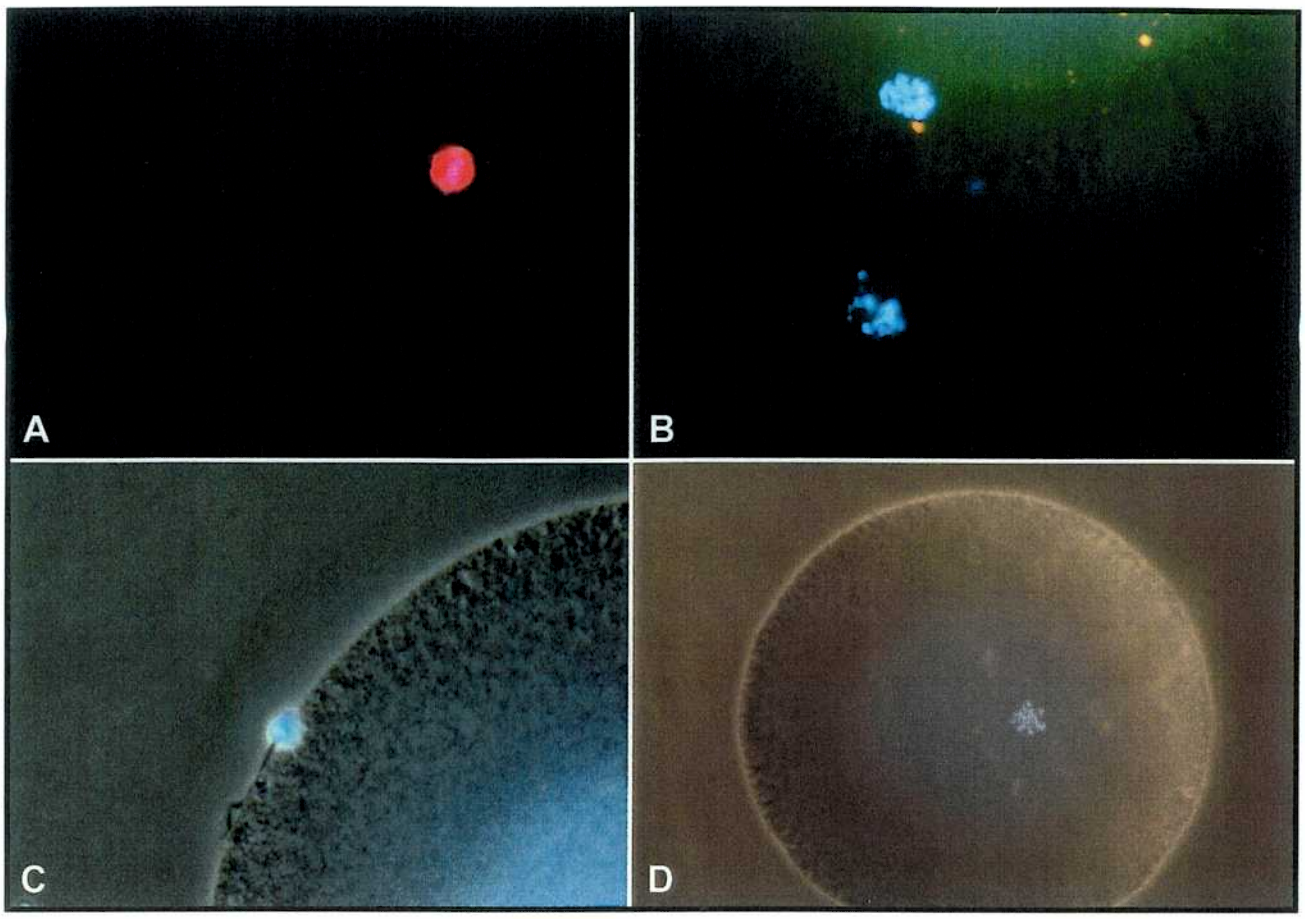
Núcleo Telofásico: Esta situación, al igual que la anterior, se puso en evidencia luego del estudio citogenético de los oocitos que no desarrollaron pronúcleos y habían expulsado dos cuerpos polares. En estos oocitos se formaron núcleos tipo telofásicos, con densos grupos de cromatina dentro del oocito como en el segundo cuerpo polar. Una evidencia de este estadio de falla en la transición a interfase y por lo tanto de la fecundación se representa en la Figura 16A.

d) Subnucleación, detención en estadio de pronúcleos o en singamia

En esta categoría se evidencian los defectos en los procesos de nucleación, o migración de pronúcleos, deteniéndose el desarrollo antes de la organización de la primera placa metafásica del cigoto. La característica de este estadio es la formación de varios *subnúcleos* o cariomeras maternas que se caracterizan por la formación de distintos grupos de material nuclear disperso en el citoplasma del oocito (subnúcleos). El estadio de *pronúcleos* y el de *singamia* se caracterizan por el desarrollo de material nuclear disperso en el citoplasma del oocito en dos grupos bien definidos. En el estadio de singamia se observó una mayor aproximación de los pronúcleos y la condensación del material genético fue mayor. Estas categorías solo fueron observadas por inmunofluorescencia debido al estado de descondensación del material nuclear. Salvo en los casos de desaparición de la membrana nuclear de ambos pronúcleos y condensación de los cromosomas, este estadio fue detectado también utilizando la técnica de Tarkowski (Figura 17). En esta categoría la disposición de los microtúbulos fue homogénea en todo el citoplasma del oocito alrededor del material nuclear en cuestión.

Figura 14. Ausencia de penetración o inyección "fallida" del espermatozoide

A: Huso meiótico de un oocito MII no penetrado luego de FIV. B: Primer cuerpo polar y placa metafásica de un oocito en MII que no ha sido penetrado por un espermatozoide. C: Espermatozoide que permaneció en el espacio perivitelino asociado a la membrana plasmática del oocito pero sin penetrar a través de ella. D: Microscopía de contraste de fase y de fluorescencia que permite visualizar la placa metafásica de un oocito no penetrado luego de FIV. Magnificación: A B y D: 60x; C: 100x. Rojo: huso meiótico (β tubulinas- Cy3), Azul: ADN (Hoescht 33258). *Fotografía tomada por V. Rawe en Laboratorio de Investigación y Estudios Especiales de CEGyR.*


A
B
C
D

e) Detención en metafase de la primera división mitótica del cigoto

La *detención en metafase* de la primera mitosis del embrión se caracterizó por la presencia de material nuclear condensado (cromosomas) en forma de placa metafásica. Esta categoría se detectó por inmunofluorescencia y también a través de la técnica de Tarkowski (Figura 16C) con la que fue posible contabilizar los cromosomas formados en la mayoría de los oocitos estudiados. Por otro lado, la distribución de β tubulinas fue acorde con la característica disposición de un huso mitótico con microtúbulos en forma de áster bipolar.

f) Otros

En baja proporción se detectaron eventos no directamente relacionados a la dinámica de reorganización del citoesqueleto. Uno de estos ejemplos es la penetración de dos espermatozoides (*dispermia*, Figura 18), situación en la que se visualizan dos grupos de ADN espermático y la presencia de dos flagelos.

Una situación muy peculiar es el *despegado de cola del espermatozoide*. Esta situación trae como consecuencia la falla en la fecundación ya que no se reclutan los microtúbulos a partir del centro organizador de microtúbulos situado en la base de la cabeza del espermatozoide. En esta causa de falla de fecundación se puede evidenciar la presencia de material genético paterno separado del flagelo espermático.

Otra situación dentro de esta categoría es la alteración de la placa metafásica del oocito debida a una interferencia por parte del espermatozoide (Figura 16). Esta situación puede ser producto de la técnica de ICSI y la dimos en llamar inyección sobre MII, o puede ser un error durante el proceso de fecundación luego de FIV (asociación en MII). En esta causa de falla de fecundación se puede observar la presencia de material genético paterno y el flagelo espermático sobre la Metafase II del oocito.

2. FRECUENCIAS HALLADAS EN CADA TÉCNICA DE Reproducción Asistida

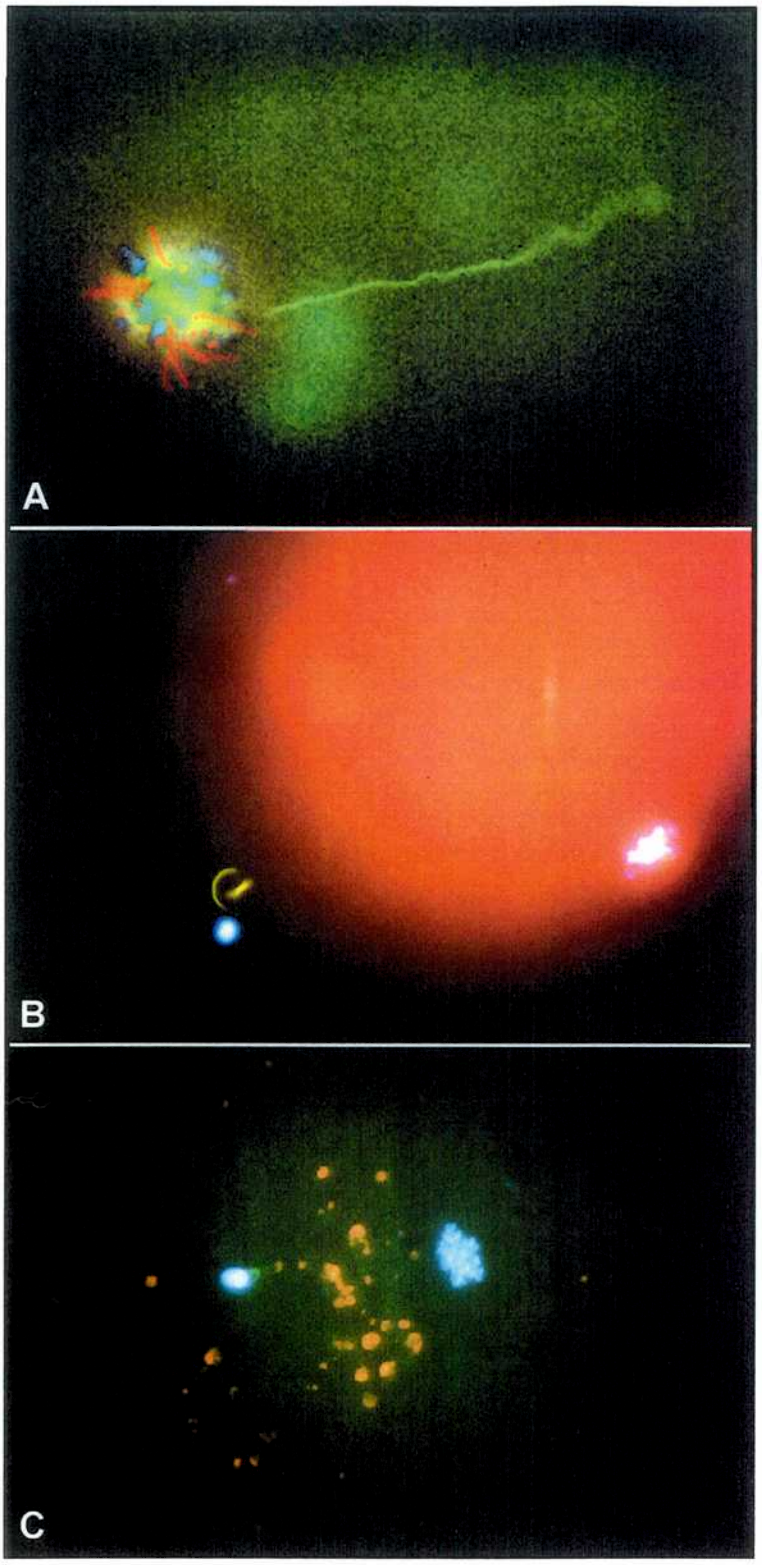
A. INMUNOFLUORESCENCIA

- **FIV**

La principal causa de falla de fecundación luego de FIV fue la <u>ausencia de penetración</u> espermática (Tabla IA, 59,2%), observación que fue estadísticamente significativa si se la compara con ICSI ($p<0,001$, Tabla III).

Figura 15. Falla total de activación oocitaria en asociación con condensación prematura de cromosomas y falla de descondensación de la cromatina del espermatozoide.

A: Espermatozoide que sufrió condensación prematura de cromosomas (PCC) luego de ICSI. B: Espermatozoide que permaneció intacto luego de ser inyectado junto al material genético del oocito rodeado por β tubulinas del huso meiótico. C: Espermatozoide que permaneció intacto cerca del material nuclear del oocito. Magnificación: A: 100x; B y C: 60x. Rojo: huso meiótico (β tubulinas- Cy3), Azul: ADN (Hoescht 33258), Verde: cola del espermatozoide (α tubulinas acetiladas- Acpo. Secundario- FITC). *Fotografías tomadas por V. Rawe en el Laboratorio de Investigación y Estudios Especiales de CEGyR.*


A
B
C

El 10,5% de los oocitos estudiados, mostraron una falla de activación oocitaria con distintos grados de descondensación del material genético paterno (indicados como spz + y spz ++ en Tabla IA). Un 7,1% de los oocitos "no fecundados" mostraron espermatozoides en su interior con algún grado de descondensación de la cromatina. Un 3,4% de los oocitos estudiados por otra parte, mostraron PCC. En total, un 10,5% de los oocitos estudiados fallaron en la activación oocitaria y mostraron en su interior un espermatozoide con alguna de las situaciones antes descriptas (Tabla IA). Esta observación resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo de oocitos provenientes de ICSI (Tabla III).

Se estableció la presuntiva presencia de activaciones abortivas con una baja frecuencia luego de FIV (0,7%, Tabla IB). Esta situación fue evidenciada con detalle cuando se realizo la técnica de Tarkowski a los oocitos sin desarrollo de pronúcleos y con expulsión de dos cuerpos polares (ver luego).

El 15,2% de los oocitos presentaron fallas en los procesos de nucleación, o migración de pronúcleos, deteniéndose antes de la organización de la primera placa metafásica del desarrollo del cigoto (Tabla IB).

En 10 oocitos (3,8% de los oocitos estudiados) se detectaron detenciones en la primera placa metafásica (Tabla IC), luego de FIV.

En la Tabla IC se puede observar que luego de FIV un 10,5% de los oocitos estudiados presentan situaciones que no permiten la culminación de la fecundación, como la penetración de dos espermatozoides (dispermia, 6,4%), el despegado o disociación del flagelo del espermatozoide de la cabeza, dentro del citoplasma del oocito (1,5%) y la asociación del espermatozoide a la placa metafásica del oocito en MII (Tabla IC).

- **ICSI**

En el 12,1% de los oocitos no fecundados estudiados luego de ICSI, no se observó la presencia del espermatozoide dentro del citoplasma (spz.-, Tabla IIA). Como fue explicado con anterioridad, este evento puede deberse a la salida del espermatozoide a través del surco de inyección.

La principal causa de falla de fecundación luego de ICSI resultó ser la falla de activación oocitaria con distintos grados de descondensación del material genético paterno (36,5%,

Figura 16. Estadios de falla de fecundación luego de ICSI estudiados según la técnica de Tarkowski.

A: NT: Núcleo en telofase con dos núcleos de cromatina muy teñidas en el citoplasma, B: MIII: Metafase III. Formación de una tercera placa metafásica indicativo de activación abortiva, C: Primera placa metafásica. Detención en metafase de la primera mitosis del cigoto, D: Espermatozoide descondensando su cromatina entre los cromosomas del oocito. Este oocito pertenece a un grupo de oocitos que se utilizaron para puesta a punto y que es un ejemplo de ´inyección en MII´ (ver texto, resultados). Magnificación:100x. *Fotografías tomadas por V. Rawe en el Laboratorio de Investigación y Estudios Especiales de CEGyR.*

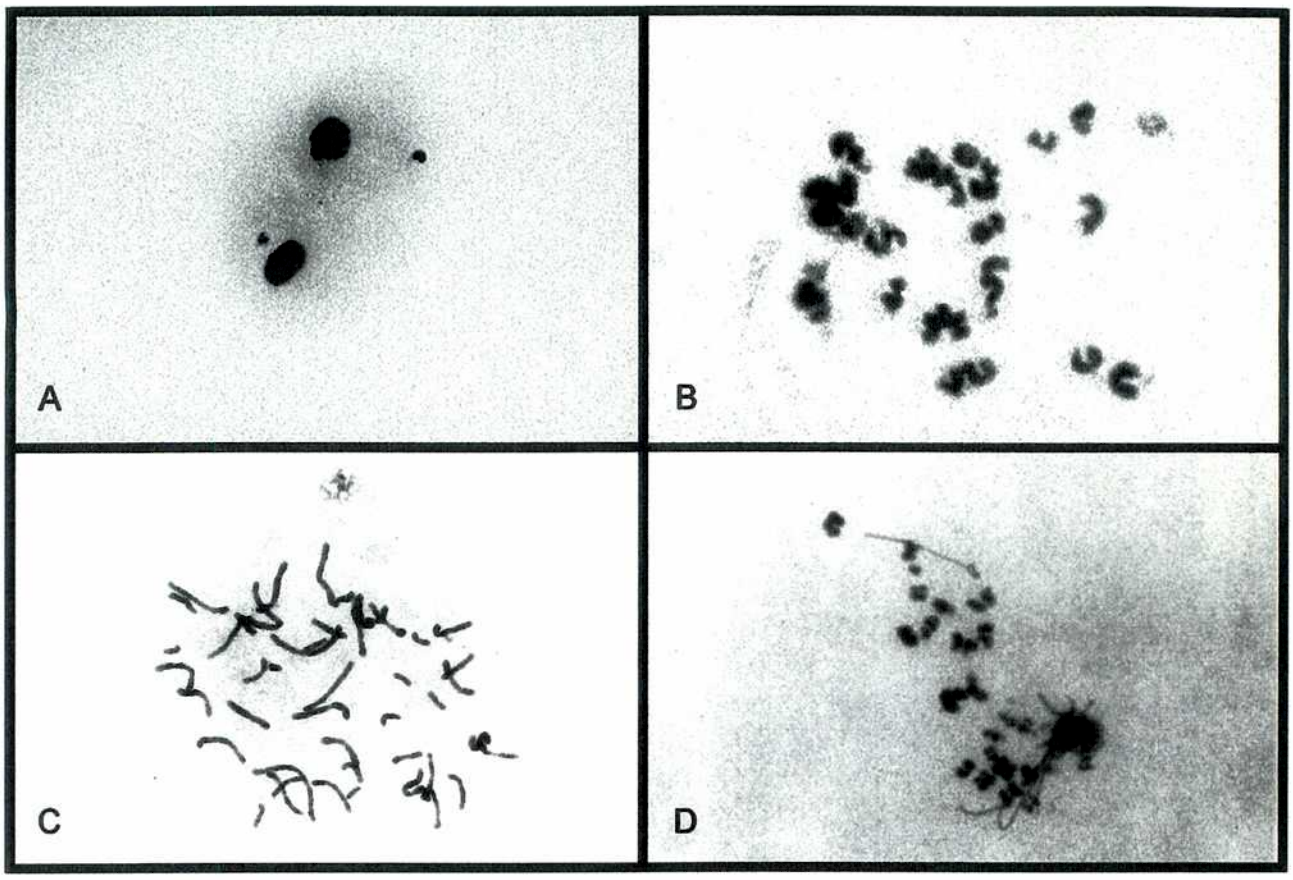

A
B
C
D

Tabla IIA). Dentro de esta categoría, la falta de descondensación del material nuclear paterno dentro del oocito fue la más significativa (spz.+ y spz. ++, Tabla IIA).

Se estableció la presuntiva presencia de activaciones abortivas (MIII, Tabla IIB) con una baja frecuencia luego de ICSI (0,6%, Tabla IIB).

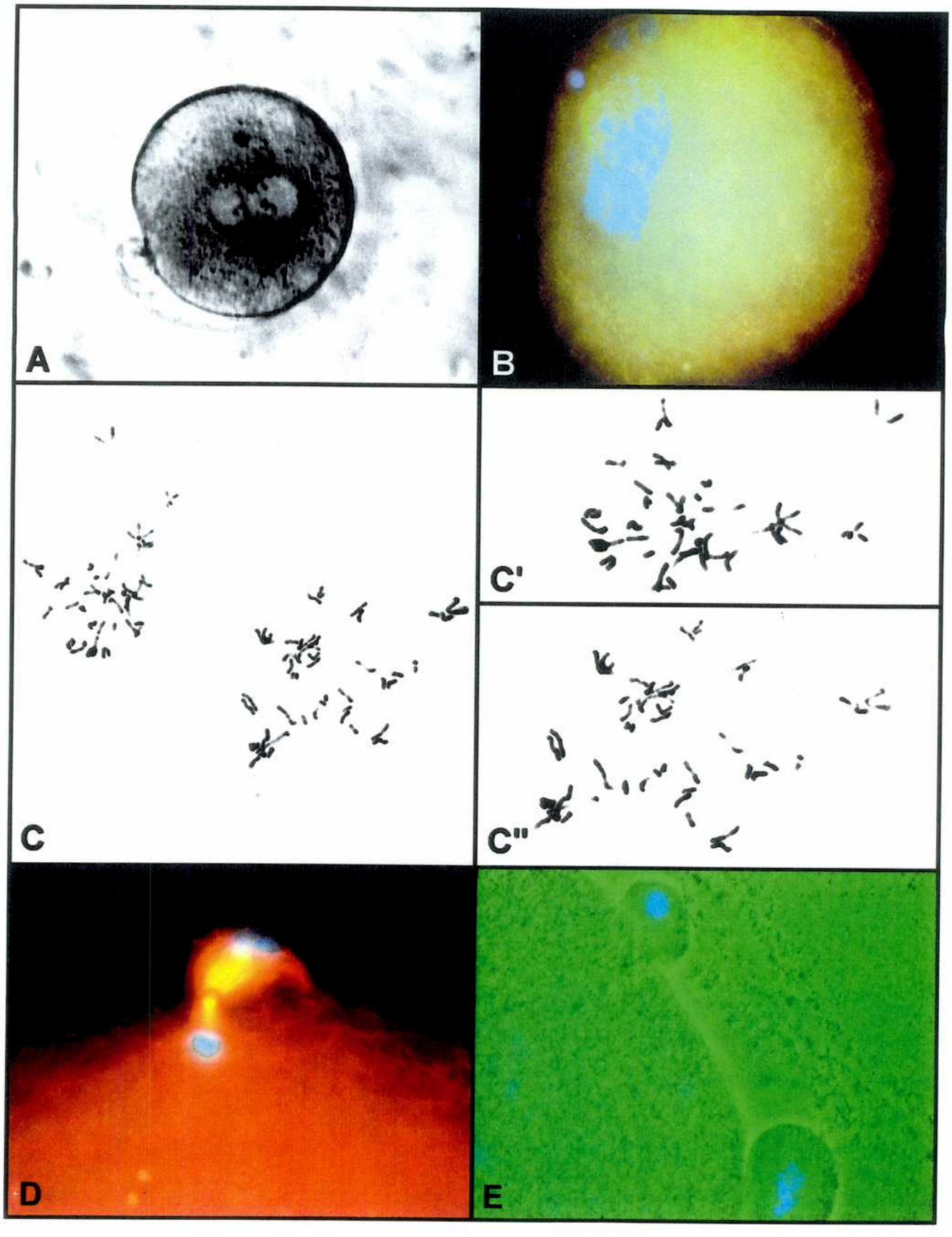
Un 21,5% de los oocitos estudiados mostraron fallas en los procesos de nucleación, o migración de pronúcleos, deteniéndose antes de la organización de la primer mitosis (Tabla IIB).
Por otro lado y a diferencia de FIV, se pudo observar que un 18,5% de los oocitos "no fecundados" detuvieron su desarrollo en la primera placa metafásica (Tabla IIC).

En la Tabla IIC se puede observar que luego de ICSI un 10,7% de los oocitos estudiados presentan situaciones que no permitieron la culminación de la fecundación, como el despegado o disociación del flagelo del espermatozoide de la cabeza, dentro del citoplasma del oocito (4,9%) y la inyección del espermatozoide sobre la placa metafásica del oocito en MII (5,8%, Tabla IIC).

En la Tabla III están representados los valores totales obtenidos en cada nivel luego de cada técnica de RA. Como era de esperar, la ausencia del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito (Nivel a) fue estadísticamente significativa a favor de FIV (59,2% vs. 12,1%, $p<0,001$). La falla de activación del oocito fue un evento mas frecuente luego de ICSI y resulto ser estadísticamente significativo si se lo compara con FIV (10,5% vs. 36,5%, Nivel b, Tabla III, $p< 0,001$). Luego del uso de la técnica de inmunofluorescencia fue posible detectar un presunto estadio de activación oocitaria abortiva que posteriormente fue confirmado con el uso de la Técnica de Tarkowski. El mencionado nivel estuvo presente en un 0,7% y un 0,6% de los oocitos 'no fecundados' luego de FIV e ICSI, respectivamente (NS, Tabla III). Los defectos en la formación de pronúcleos y en la migración de los mismos resultaron en un 15,2% luego de FIV y en un 21,5% luego de ICSI, situación que no resultó ser estadísticamente significativa (Tabla III). Una de las situaciones en la que la fecundación se vio más comprometida luego de ICSI fue la detención en la primera mitosis del embrión. Este evento se generó en un 3,8% luego de FIV y en un 18,5% de los casos luego de ICSI ($p<0,01$, Tabla III). La dispermia, la separación del flagelo del espermatozoide y la denominada asociación o inyección en la placa metafásica del oocito en MII, son situaciones que se presentaron con frecuencias similares y se encuentran dentro de la categoría 'otros'.

Figura 17. Oocitos detenidos durante el desarrollo de dos pronúcleos.

A: Oocito detenido durante el desarrollo de dos pronúcleos, visualizado con microscopía óptica. B: Luego del tratamiento para inmunofluorescencia (α tubulinas acetiladas- Acpo. Secundario- FITC, β tubulinas- Cy3 y ADN [Hoescht 33258]), se puede visualizar los dos pronúcleos parentales, el flagelo del espermatozoide proveniente de uno de los pronúcleos (masculino) y las tubulinas del citoplasma del oocito. C: En ciertas ocasiones, el procesamiento de oocitos con dos cuerpos polares pero sin la formación de dos pronúcleos resulta en la visualización de dos grupos de cromosomas pertenecientes a los dos pronúcleos. Este estadio pertenece al grupo de oocitos que se detienen luego de la formación de dos pronúcleos pero que no llegan a clivar. En C´ y C´´ se pueden ver los dos grupos de cromosomas parentales en detalle. D y E: En todos los oocitos detenidos en dos pronúcleos o en singamia se observa la expulsión de dos cuerpos polares. *Fotografías tomadas por V. Rawe en el Laboratorio de Investigación y Estudios Especiales de CEGyR.*


A
B
C
C'
C''
D
E

Este evento ocurre en el 10,5% y 10,7% de los oocitos que fallaron en la fecundación luego de FIV e ICSI respectivamente (NS, Tabla III).

B. ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Para validar la hipótesis de la existencia de activaciones abortivas del tipo de las descriptas por Kubiak (1989), se estudiaron 189 oocitos no fecundados que mostraron dos cuerpos polares y no mostraron pronúcleos provenientes de FIV e ICSI en 82 pacientes, entre las 20-40hs pos inseminación o inyección. Del total, 135 fueron informativos (71,4%), 61 provenientes de FIV y 74 de ICSI.
A partir de los resultados obtenidos, se pudieron establecer distintos niveles de falla de fecundación que se detallan en la sección anterior.

- **FIV**

En el grupo estudiado, 11/61 oocitos (18%) mostraron presencia de cromosomas del espermatozoide en el interior del citoplasma, evento que representa la denominada condensación prematura de cromosomas (PCC). En esta población seleccionada de oocitos se observó que existían espermatozoides con distintos grados de descondensación del material genético paterno (45,9%, spz.+ y spz.++, Tabla IV A). En un 13,1% de los casos analizados se observó la presencia de mas de un espermatozoide dentro del citoplasma del oocito. En el 77% de los oocitos estudiados se encontró o encontraron espermatozoides detenidos en algún estadio en particular (Tabla IV A).

Para procesar a un oocito siguiendo la técnica de Tarkowski, se seleccionó una población especial sin formación de pronúcleos y con dos cuerpos polares con el propósito de detectar activaciones abortivas. En el grupo de oocitos estudiados luego de FIV, se detectó un 8,2% de este tipo de activaciones, evento que es superior al detectado por inmunofluorescencia. Cabe mencionar que la tinción con Hoescht para la visualización del material genético, no permite la identificación precisa de las cromátides hermanas únicas, típicas de MIII, y por lo tanto no es posible discriminar entre MII ó MIII, salvo en muy raras ocasiones.

Se observó un 14,7% de oocitos que mostraron detención en la primera placa metafásica, evento que había sido observado por inmunofluorescencia y que se mantiene en más baja proporción si se lo compara con lo que acontece luego de ICSI (ver luego).

Figura 18. Oocito penetrado por dos espermatozoides.

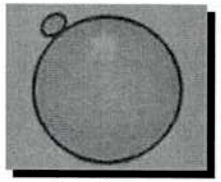
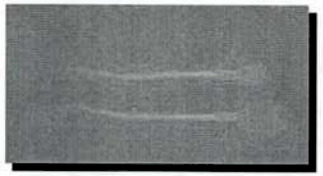
Oocito penetrado por dos espermatozoides (dispérmico) luego de FIV. Magriificaciórı: 60x. Azul: ADN (Hoescht 33258), Verde: cola del espermatozoide (α tubulinas acetiladas- Acpo. Secundario- FITC). *Fotografía tomada por V. Rawe en el Laboratorio de Investigación y Estudios Especiales de CEGyR.*

- **ICSI**

En el grupo estudiado, 5/74 oocitos (6,8%, Tabla IV B), mostraron presencia de cromosomas del espermatozoide en el interior del citoplasma. Luego de ICSI también se observaron distintos grados de descondensación del material genético paterno, frecuencia similar a la obtenida por inmunofluorescencia ya que se seleccionó la población a estudiar eligiendo sólo oocitos sin formación de pronúcleos y con dos cuerpos polares.
En el grupo de oocitos estudiados se detectó un 17,5% de activaciones abortivas (Tabla V B) , evento que había sido observado en muy baja proporción cuando se realizó inmunofluorescencia, ya que, como había sido mencionado con anterioridad, la manera más precisa de poder identificar cromátides hermanas únicas es por medio de la técnica de Tarkowski.

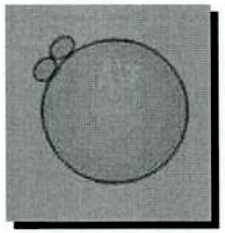
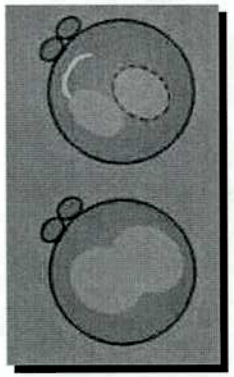
Se observó un 24,3% de oocitos que mostraron detención en la primera placa metafásica (Tabla VB), observación que se encuentra dentro de lo esperado luego de ICSI y que sigue resultando mayor que la observada luego de FIV (ver luego, Tabla VI, $p<0,01$).
En la Tabla VI están representados los valores totales obtenidos en cada nivel luego de cada técnica de RA. Luego del uso de la técnica de Tarkowski fue posible detectar situaciones en las cuales el material genético masculino se veía detenido en distintos estadios. Esta situación no fue similar luego de FIV e ICSI (Tabla VI, $p< 0,01$). Con la técnica de inmunofluorescencia se había podido un presunto estadio de activación oocitaria abortiva que posteriormente fue confirmado con el uso de la Técnica de Tarkowski. El mencionado nivel estuvo presente en un 0,7% y un 0,6% de los oocitos 'no fecundados' luego de FIV e ICSI respectivamente (NS, Tabla III). Con el análisis citogenético esta situación se evidenció en un 8,2% luego de FIV y 17,5% luego de ICSI (Tabla VI, $p< 0,01$). Una de las situaciones en la que la fecundación se vio más comprometida luego de ICSI fue la detención en la primera mitosis del embrión. Este evento se generó en un 14,7% y en un 24,3% de los casos luego de FIV e ICSI respectivamente ($p<0,01$, Tabla VI).

TABLA IA. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE FIV

Nivel	Categoría	FIV Oocitos/Total	Totales (%)	Representación
a) Ausencia de penetración o inyección fallida	- MII (spz-)	157/265	(59,2)	
b) Falla total de activación oocitaria	- MII (c/ PCC) - MII (c/ spz. +)	9/265 (3,4) 11/265 (4,1)	(10,5)	

- MII (spz-): Oocito MII aparentemente normal, que no ha sido penetrado luego de FIV.**- MII (c/PCC):** Oocito MII aparentemente normal, que ha sufrido condensación prematura de cromosomas.**- MII (c/spz+):** Oocito MII aparentemente normal, que contiene un espermatozoide con *mínimo* grado de descondensación, definido como+. **- MII (c/spz. ++):** Oocito MII aparentemente normal, que contiene un espermatozoide con *poco* grado de descondensación, definido como ++.

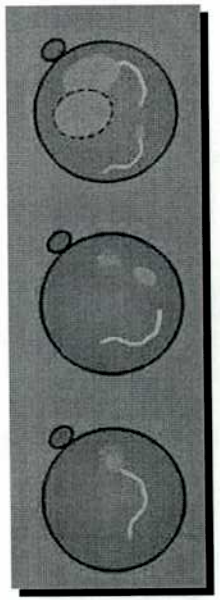
TABLA IB. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE FIV

Nivel	Categoría	FIV Oocitos/Total	Totales (%)	Representación
c) Activación abortiva	- MIII (c/spz., 2CP)	2/265	(0,7)	
d) Defectos en pronucleación /migración	- Subnucleado (c/spz. intacto)	6/265 (2,3)		
	- Pronucleado (c/ spz. +++)	15/265 (5,7)	(15,2)	
	- Singamia (c/ spz. ++++)	19/265 (7,2)		

-MIII (c/spz., 2CP): Activación abortiva, con liberación de segundo corpúsculo polar. (Ver explicación en el texto) **.- Subnucleado (c/spz. intacto) :** Acumulo de ADN materno en una región del citoplasma (por lo general cerca de la corteza). También llamado cariomeras maternas.**- Pronucleado (c/ spz. +++):** El oocito expulsa el segundo corpúsculo polar, pero se detiene en la formación de dos pronúcleos, con el espermatozoide con grado de descondensación *intermedio*, definido como +++ **.- Singamia (c/ spz. ++++):** Dos núcleos haploides c/ AND disperso y totalmente descondensado, el espermatozoide se encuentra en su *máximo* grado de descondensación, definido como ++++..

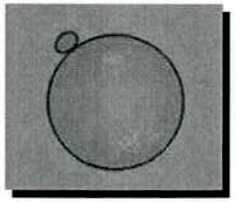
TABLA IC. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE FIV

Nivel	Categoría [1]	FIV Oocitos/Total	Totales (%)	Representación
e) Detención metafásica	- 1 ra placa metafásica	10/265	(3,8)	
f) Otros	- Dispérmico	17/265 (6,4)	(10,5)	
	- Despegado de cola	4/265 (1,5)		
	- Asociación en MII	7/265 (2,6)		



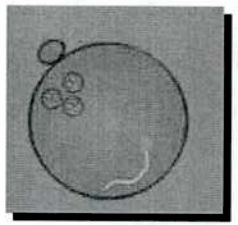
- **1 ra placa metafásica:** Placa metafásica de la primera división mitótica del embrión. **- Dispérmico:** Penetración por dos espermatozoides con o sin descondensación de alguno de ellos.- Despegado de cola: Ocurre separación del ADN del espermatozoide de la cola y el centro organizador de microtúbulos (MTOC), no pudiéndose formar áster para la aposición de pronúcleos y primera división mitótica.**- Asociación en MII:** El espermatozoide interfirió con el huso y cromosomas maternos.

TABLA II A. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE ICSI

Nivel	Categoría	ICSI Oocitos/Total	Totales (%)	Representación
a) Ausencia de penetración o inyección fallida	- MII (spz⁻)	40/329	**(12,1)**	
b) Falla total de activación oocitaria	- MII (c/ PCC) - MII (c/ spz. +) - MII (c/ spz. ++)	22/329 (6,7) 69/329 (21) 29/329 (8,8)	**(36,5)**	

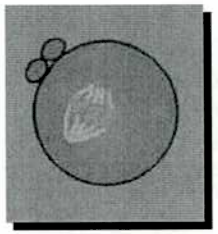
- MII (spz-): Oocito MII aparentemente normal, sin espermatozoide en su interior.**- MII (c/PCC):** Oocito MII aparentemente normal, que ha sufrido condensación prematura de cromosomas.**- MII (c/spz+):** Oocito MII aparentemente normal, que contiene un espermatozoide con *mínimo* grado de descondensación, definido como +. **- MII (c/spz. ++):** Oocito MII aparentemente normal, que contiene un espermatozoide con *poco* grado de descondensación, definido como ++.

TABLA II B. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE ICSI

Nivel	Categoría	ICSI Oocitos/Total	Totales (%)	Representación
c) Activación abortiva	- MIII (c/spz., 2CP)	2/329	**(0,6)**	
d) Defectos en pronucleación /migración	- Subnucleado (c/spz. intacto)	14/329 (4,2)		
	- Pronucleado (c/ spz. +++)	39/329 (11,8)	**(21,5)**	
	- Singamia (c/ spz. ++++)	18/329 (5,5)		

-MIII (c/spz., 2CP): Activación abortiva, con liberación de segundo corpúsculo polar. (Ver explicación en el texto) .- Subnucleado (c/spz. intacto) : Acumulo de ADN materno en una región del citoplasma (por lo general cerca de la corteza). También llamado cariomeras maternas.- Pronucleado (c/ spz. +++): El oocito expulsa el segundo corpúsculo polar, pero se detiene en la formación de dos pronúcleos, con el espermatozoide con grado de descondensación *intermedio*, definido como +++ .- Singamia (c/ spz. ++++): Dos núcleos haploides con ADN disperso y totalmente descondensado, el espermatozoide se encuentra en su *máximo* grado de descondensación, definido como ++++..

TABLA II C. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE ICSI

Nivel	Categoría	ICSI Oocitos/Total	Totales (%)	Representación
e) Detención metafásica	- 1 ra placa metafásica	61/329	**(18,5)**	
f) Otros	- Dispérmico	0/329 (0)	**(10,7)**	
	- Despegado de cola	16/329 (4,9)		
	- Inyección en MII	19/329 (5,8)		

1 ra placa metafásica: Placa metafásica de la primera división mitótica. - Dispérmico: Penetración por dos espermatozoides con o sin descondensación de alguno de ellos.- Despegado de cola: Ocurre separación del ADN del espermatozoide de la cola y el centro organizador de microtúbulos (MTOC), no pudiéndose formar áster para la aposición de pronúcleos y primera división mitótica.- Inyección en MII: Al ser inyectado, el espermatozoide interfirió con el huso y cromosomas maternos.

TABLA III. FALLAS DE FECUNDACIÓN EN OOCITOS PROVENIENTES DE FIV E ICSI. VALORES TOTALES

NIVEL	FIV	ICSI	P
a) AUSENCIA DE PENETRACIÓN O INYECCIÓN FALLIDA	59,2%	12,1%	*[a]
b) FALLA DE ACTIVACIÓN	10,5%	36,5%	*
c) ACTIVACIÓN ABORTIVA	0,7%	0,6%	NS
d) DEFECTOS EN PRONUCLEACIÓN /MIGRACIÓN	15,2%	21,5%	NS
e) DETENCIÓN METAFÁSICA	3,8%	18,5%	*
f) OTROS	10,5%	10,7%	NS

[a] Los asteriscos indican diferencias significativas (P< 0,01) entre porcentajes en la misma columna entre FIV e ICSI.

TABLA IV A. ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE OOCITOS QUE NO MOSTRARON PRONÚCLEOS CON LA EXPULSIÓN DE DOS CUERPOS POLARES LUEGO DE FIV

Nivel	Categoría [a]	FIV Oocitos/Total (%)	Totales (%)
a) Configuración del ADN masculino	- cromosomas del spz.	11/61 (18)	**(77)**
	- spz. +	15/61 (24,6)	
	- spz. ++	13/61 (21,3)	
	- Dispérmico	8/61 (13,1)	

[a] Abreviaturas: spz.+: espermatozoide intacto, spz.++: espermatozoide ligeramente descondensado

TABLA IV B. ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE OOCITOS QUE NO MOSTRARON PRONÚCLEOS CON LA EXPULSIÓN DE DOS CUERPOS POLARES LUEGO DE FIV

Nivel	Categoría [a]	FIV Oocitos/Total (%)	Totales (%)
b) Activación abortiva	- MIII	2/61 (3,3)	**(8,2)**
	- NR	2/61 (3,3)	
	- NT	1/61 (1,6)	
c) Detención en metafase	- Primera placa metafásica	9/61 (14,7)	**(14,7)**

[a] Abreviaturas: MIII: oocito metafase III, NR: Núcleo Reticular, NT: Núcleo en Telofase.

TABLA V A. ANÁLISIS CITOGENETICO DE OOCITOS QUE NO MOSTRARON PRONÚCLEOS CON LA EXPULSIÓN DE DOS CUERPOS POLARES LUEGO DE ICSI

Nivel	Categoría [a]	ICSI Oocitos/Total (%)	Totales (%)
a) Configuración del ADN masculino	- cromosomas del spz.	5/74 (6,8)	**(58,1)**
	- spz. +	20/74 (27)	
	- spz. ++	18/74 (24,3)	
	- Dispérmico	0/74 (0)	

[a] Abreviaturas: spz.+: espermatozoide intacto, spz.++: espermatozoide ligeramente descondensado

TABLA V B. ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE OOCITOS QUE NO MOSTRARON PRONÚCLEOS CON LA EXPULSIÓN DE DOS CUERPOS POLARES LUEGO DE ICSI

Nivel	Categoría [a]	ICSI Oocitos/Total (%)	Totales (%)
b) Activación abortiva	- MIII	6/74 (8,1)	**(17,5)**
	- NR	4/74 (5,4)	
	- NT	3/74 (4)	
c) Detención en metafase	- Primera placa metafásica	18/74 (24,3)	**(24,3)**

[a] Abreviaturas: MIII: oocito metafase III, NR: Núcleo Reticular, NT: Núcleo en Telofase.

TABLA VI. ANÁLISIS CITOGENËTICO. VALORES TOTALES.

NIVEL	FIV	ICSI	P
A) CONFIGURACIÓN DEL ADN MASCULINO	**77%**	**58,1%**	
B) ACTIVACIÓN ABORTIVA	**8,2%**	**17,5%**	*
C) DETENCIÓN EN METAFASE	**14,7%**	**24,3%**	*

[a] Los asteriscos indican diferencias significativas (P< 0,01) entre porcentajes en la misma columna entre FIV e ICSI.

CAPÍTULO II
FECUNDACIÓN ANORMAL

Al igual que para oocitos que sufrieron falla de fecundación, el material procesado se visualizó por microscopía de contraste de fase de modo de obtener información acerca del estado del citoplasma, número de cuerpos polares, número de pronúcleos y/o subnúcleos y presencia de fragmentos Se estudiaron los oocitos que mostraron cantidad anormal de pronúcleos y/o subnúcleos (1, 3, y 4 PNs). Este paso se realizó para obtener información adicional acerca de las posibles causas de fecundación anormal conjuntamente con el análisis con fluorescencia.

El número total de oocitos visualizados con microscopio de luz transmitida y estudiados por inmunofluorescencia fue de 153, provenientes de 55 pacientes luego de la realización de FIV e ICSI. De los 153 oocitos fecundados anormalmente, el 100% fueron analizables por inmunofluorescencia, 84 luego de la realización de FIV y 69 luego de ICSI.

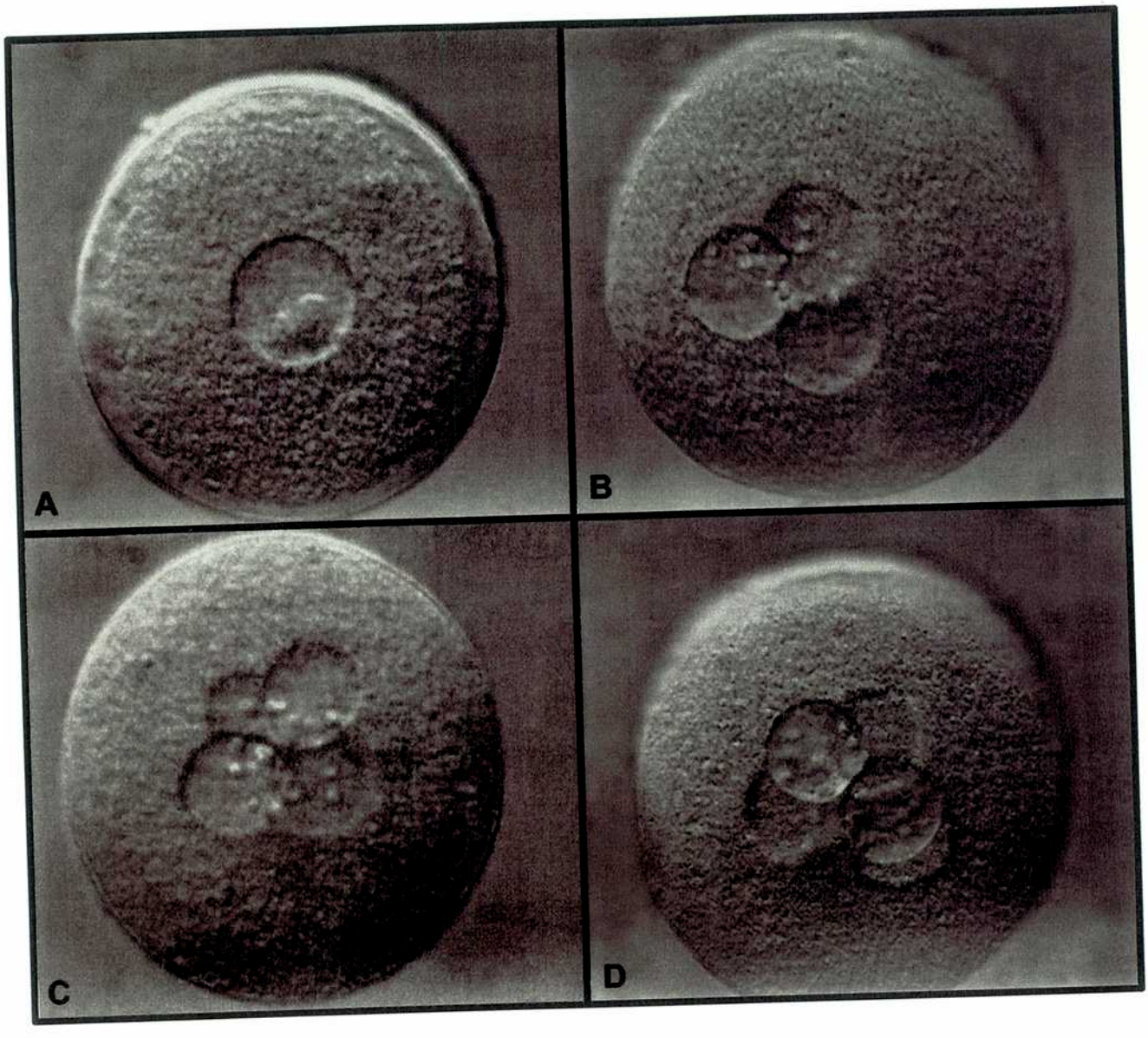
A partir de los resultados obtenidos, se pudo establecer la existencia de distintos niveles de fallas en la fecundación normal. A continuación se describen los distintos estadios hallados. Las categorías descriptas se hallaron tanto en oocitos sometidos a FIV como ICSI, aunque las frecuencias de cada categoría variaron según la técnica de RA utilizada (Figura 19).

1. DESCRIPCIÓN DE LAS CATEGORÍAS HALLADAS

a) Cigotos monopronucleados

Este estadio se evidenció por la presencia de un solo pronúcleo en el interior del oocito fecundado. El desarrollo de este tipo de fecundación anómala se acompañó de la presencia de uno o dos cuerpos polares. La existencia de material genético materno o paterno (acompañado del flagelo del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito), conjuntamente con la expulsión de uno o dos cuerpos polares nos permitió determinar el probable origen de estos oocitos.

> *Desarrollo partenogenético*: Se pudo observar la presencia de un pronúcleo sin evidencias de flagelo espermático. En estos casos se visualiza la expulsión de dos cuerpos polares producto de una activación partenogenética sin intervención del espermatozoide.


A
B
C
D

El citoplasma del oocito se observa normalmente homogéneo con respecto a la distribución de β tubulinas (uniformes, sin evidencias de alteración de microtúbulos).

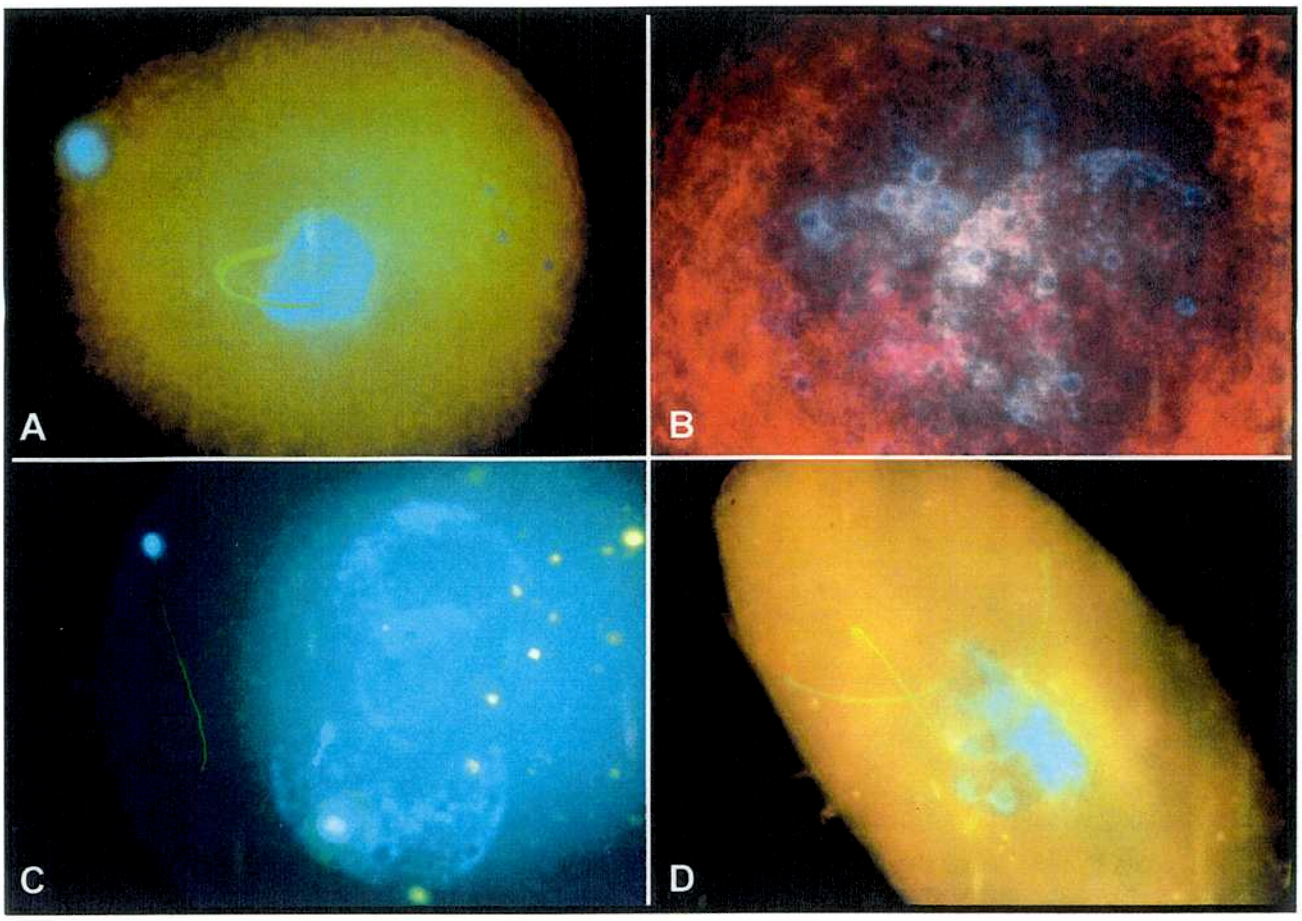
Desarrollo ginogenético: Sólo se pudo observar la presencia de un pronúcleo sin evidencias de flagelo espermático. En estos casos se visualiza la expulsión de dos cuerpos polares producto de una activación provocada por intervención del espermatozoide como estimulo activador.
El citoplasma del oocito se visualiza normalmente homogéneo con respecto a la distribución de β tubulinas (uniformes, sin evidencias de alteración de microtúbulos).

Desarrollo androgenético: En estos casos sólo se pudo evidenciar la presencia de material nuclear paterno asociado a un flagelo espermático. En estos casos se visualiza la expulsión de dos cuerpos polares reflejo de una activación oocitaria producto de la intervención del espermatozoide. Al igual que el desarrollo partenogenético y ginogenético, el citoplasma del oocito se visualiza normalmente homogéneo con respecto a la distribución de β tubulinas. Un ejemplo de esta situación está representado en la Figura 20.

b) Cigotos multipronucleados

Este estadio se evidenció por la presencia de tres o cuatro pronúcleos en el interior del oocito fecundado. El desarrollo de este tipo de fecundación anómala se acompañó de la presencia de uno o dos cuerpos polares. La existencia de material genético materno o paterno (acompañado del flagelo del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito), conjuntamente con la expulsión de uno o dos cuerpos polares nos permitió determinar el probable origen de estos oocitos.

Desarrollo triploide digínico: En estos casos se pudo evidenciar la presencia de tres pronúcleos y la expulsión de un cuerpo polar. Los tres pronúcleos fueron el resultado de dos conjuntos o grupos de material nuclear materno y la presencia de material nuclear paterno asociado a un flagelo espermático. El ADN de origen materno organizado en 2 PNs resulto de la falta de expulsión del segundo cuerpo polar. El citoplasma del oocito se visualizó normalmente homogéneo con respecto a la distribución de β tubulinas. Un ejemplo de esta situación se ilustra en la Figura 20.


A
B
C
D

Desarrollo triploide diándrico: En estos casos se pudo evidenciar la presencia de tres pronúcleos y la expulsión de dos cuerpos polares. Los tres pronúcleos fueron el resultado de dos conjuntos o grupos de material nuclear paterno asociados a dos flagelos espermáticos y la presencia de material nuclear materno. El citoplasma del oocito se visualizó normalmente homogéneo con respecto a la distribución de β tubulinas.

c) Cigotos subnucleados

Este estadio se evidenció por la presencia de uno, tres, cuatro o cinco subnúcleos en el interior del oocito fecundado. Se determinó la presencia de subnúcleos ya que el desarrollo de los mismos se pudo evidenciar por la aparición de núcleos de tamaño más pequeño producto tal vez de la división de pronúcleos mayores. El desarrollo de este tipo de fecundación anómala se acompañó de la presencia de uno o dos cuerpos polares. La existencia de material genético materno o paterno (acompañado del flagelo del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito), conjuntamente con la expulsión de uno o dos cuerpos polares nos permitió determinar el probable origen de estos oocitos. Un ejemplo de esta situación está representado en la Figura 20.

2. FRECUENCIAS HALLADAS EN FIV E ICSI

En la tabla VII se representaron los porcentajes totales de oocitos fecundados anormalmente luego de FIV e ICSI. A continuación se detallan los hallazgos obtenidos de cada grupo en particular.

- Cigotos monopronucleados

Se detectaron un total de 19 cigotos con 1PN luego de FIV (22,6% del total estudiado) y un total de 49 cigotos con 1PN luego de ICSI (65,2% del total estudiado). El desarrollo de un pronúcleo resultó ser el patrón de fertilización anormal más comúnmente encontrado luego de ICSI, con una frecuencia estadísticamente significativa si se la compara con FIV ($p< 0,001$). Dentro de este nivel de clasificación se observaron dos categorías: 1PN con un sólo CP o 1PN con 2CPs (Tabla VIII). La presencia de 1PN/1CP no es estadísticamente distinta entre ambos grupos (10,7% en FIV y 10,1% luego de ICSI, Tabla VIII); sin embargo, la presencia de 1PN/2CP fue notoriamente superior luego de ICSI (55,1% vs. 11,9% en FIV, $p< 0,001$).

- Cigotos multipronucleados

Un total de 60 cigotos mostraron tres y cuatro pronúcleos luego de FIV (71,4%) y 22 cigotos presentaron las mismas características luego de ICSI (31,4% de los cigotos anormales estudiados) (Figura 19). Contrariamente a lo que ocurre en ICSI, el desarrollo de tres y cuatro pronúcleos es el patrón de fertilización anormal más comúnmente encontrado luego de FIV (en especial 3PN y 2CP) y es estadísticamente significativo si se lo compara con ICSI (Tabla IX, $p< 0,001$). La presencia de cuatro pronúcleos representa un muy bajo porcentaje de los casos luego de FIV (3,6% de los oocitos fecundados anormalmente, Tabla IX) y no se detectó esta categoría luego de ICSI.

- Cigotos subnucleados

La formación de cigotos subnucleados se detectó en un porcentaje bajo pero estadísticamente diferente luego FIV (6%) e ICSI (2,9%, Tabla X, $p< 0,01$)
Independientemente del número de pronúcleos desarrollados, las β tubulinas se encontraron uniformemente distribuidas en toda la superficie del cigoto con una mayor concentración en la periferia. No se observó ningún tipo de alteración de la distribución de estos componentes con relación al nivel de ploidía y/o su origen, así como tampoco con respecto a la distribución en cigotos diploides normales (2PN). Este patrón de distribución de tubulinas, semejante al observado en embriones diploides biparentales normales, es distinto al encontrado en 'fallas de fecundación' donde la distribución es heterogénea y localizada.

Tabla VII. Totales de cigotos fecundados anormalmente luego de FIV e ICSI

CONTENIDO NUCLEAR	FIV (n=84)	ICSI (n=69)	p*
1PN	19 (22,6%)	45 (65,2%)	<0,001
≥3PNs	65 (77,4%)	24 (34,8%)	<0,001

PN: Pronúcleo, CP: Cuerpo Polar

En la categoría ≥3PN se incluyeron los oocitos fecundados con ≥3PNs y subnúcleos

* Los valores de p se obtuvieron aplicando el test de χ^2.

Tabla VIII. Distribución de cigotos con 1PN luego de FIV e ICSI

CONTENIDO NUCLEAR	spz	FIV (n=84)	ICSI (n=69)	p*
• 1PN, 1CP		5 (5,9)	7 (10,1)	
	+	2 (2,4)	0	
	+d	2 (2,4)	0	
	Total	**9 (10,7)**	**7 (10,1)**	NS
• 1PN, 2CP		2 (2,4)	2 (2,9)	
	+	2 (2,4)	10 (11,9)	
	+d	6 (7,1)	26 (37,7)	
	Total	**10 (11,9)**	**38 (55,1)**	< 0,001

Los valores representados entre paréntesis corresponden a porcentajes de oocitos fecundados anormalmente dentro de cada categoría con relación al total de oocitos estudiados en FIV e ICSI.
PN: Pronúcleo, CP: Cuerpo Polar, SN: Subnúcleo, spz: Espermatozoide, -: spz. Ausente, +: spz. no descondensado, ++: Dos spz. no descondensados, +d: Un spz. descondensado formando pronúcleo, +d+d: Dos spz. descondensados formando pronúcleos, +/+d: spz no descondensado más spz. descondensado formando pronúcleo, +/+d+d: spz no descondensado más dos spz. descondensados formando pronúcleos. *Los valores de p se obtuvieron aplicando el test de χ^2. NS: no significativo.

Tabla IX. Distribución de cigotos multipronucleados luego de FIV e ICSI

CONTENIDO NUCLEAR	spz	FIV (n=84)	ICSI (n=69)	p*
• 3PN,1CP	+/+d	9 (10,7)	0	
	+d	10 (11,9)	16 (23,2)	
	Total	**19 (22,6)**	**16 (23,2)**	NS
• 3PN, 2CP	+	15 (17,9)	6 (8,7)	
	++d	18 (21,4)	0	
	+/+d	5 (6)	0	
	Total	**38 (45,3)**	**6 (8,7)**	< 0,001
• 4PN, 1CP	++d	2 (2,4)	0	
	+/+d+d	1 (1,2)	0	
	Total	**3 (3,6)**	**0**	

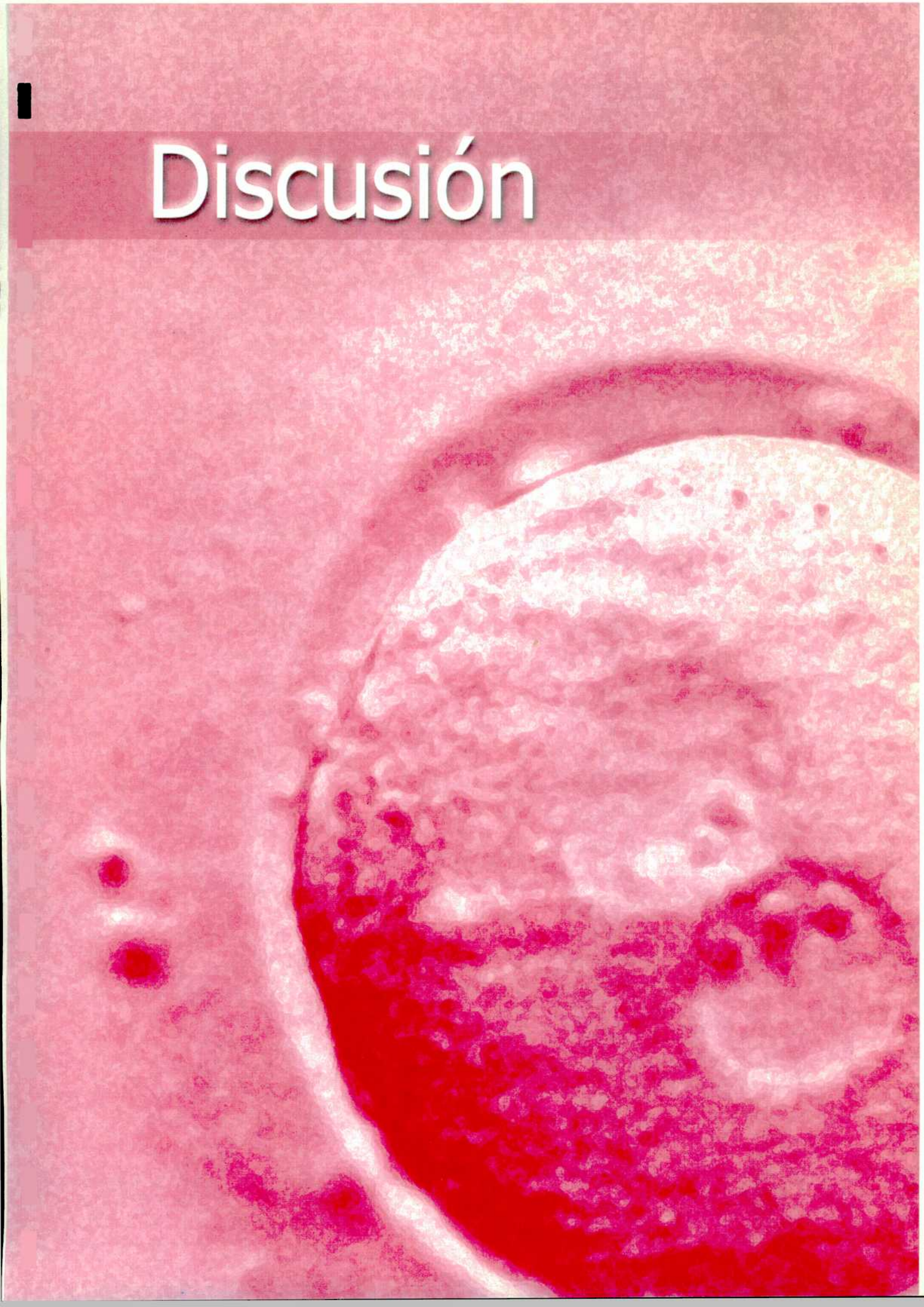
Los valores representados entre paréntesis corresponden a porcentajes de oocitos fecundados anormalmente dentro de cada categoría con relación al total de oocitos estudiados en FIV e ICSI.
PN: Pronúcleo, CP: Cuerpo Polar, SN: Subnúcleo, spz: Espermatozoide, -: spz. Ausente, +: spz. no descondensado, ++: Dos spz. no descondensados, +d: Un spz. descondensado formando pronúcleo, +d+d: Dos spz. descondensados formando pronúcleos, +/+d: spz no descondensado más spz. descondensado formando pronúcleo, +/+d+d: spz no descondensado más dos spz. descondensados formando pronúcleos. *:Los valores de p se obtuvieron aplicando χ^2. NS: no significativo.

Tabla X. Distribución de cigotos subnucleados luego de FIV e ICSI

CONTENIDO NUCLEAR	spz	FIV (n=84)	ICSI (n=69)	p*
≥ 3SN, 1CP	-	2 (2,4)	0	
	+	0	2 (2,9)	
	++	1 (1,2)	0	
	+d+d	2 (2,4)	0	
	Total	**5(6)**	**2 (2,9)**	< 0,01

Los valores representados entre paréntesis corresponden a porcentajes de oocitos fecundados anormalmente dentro de cada categoría con relación al total de oocitos estudiados en FIV e ICSI.
PN: Pronúcleo, CP: Cuerpo Polar, SN: Subnúcleo, spz: Espermatozoide, -: spz. Ausente, +: spz. no descondensado, ++: Dos spz. no descondensados, +d: Un spz. descondensado formando pronúcleo, +d+d: Dos spz. descondensados formando pronúcleos, +/+d: spz no descondensado más spz. descondensado formando pronúcleo, +/+d+d: spz no descondensado más dos spz. descondensados formando pronúcleos. * Los valores de p se obtuvieron aplicando el test de χ^2.

Discusión



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la detención del desarrollo en humanos puede originarse en desequilibrios de la dinámica de organización del citoesqueleto y del material nuclear. Estas alteraciones se manifiestan de diferentes modos y ocurre tanto en los procesos de detención del desarrollo conocido como "falla de fecundación" como en "fecundación anormal".

La presencia de desbalances cromosómicos aportados por las gametas en el momento de la fecundación no es requisito necesario para que se manifiesten las alteraciones mencionadas arriba, aunque pueden coexistir con ellas.

FALLA DE FECUNDACIÓN

La Ausencia de penetración en FIV o inyección 'fallida' del espermatozoide en ICSI se evidenció por la *ausencia* de material genético paterno y de flagelo espermático dentro del citoplasma del oocito. En estos casos sólo se pudo evidenciar la presencia de la placa metafásica del oocito y en algunos casos también el primer cuerpo polar si es que no había sido removido luego del tratamiento con solución ácida de Tyrodes. Se observó que la falla de penetración espermática es la mayor causa de falla de fecundación (59,2%) luego de FIV. Recientemente, Liu y Baker (2000) reportaron que el 70% de los pacientes con falla total de fecundación luego de FIV tenían defectos de interacción espermatozoide-oocito a nivel de la zona pelúcida. No se pueden descartar en esta categoría los defectos de movilidad espermática, capacitación, reacción acrosómica o capacidad de unión a la zona pelúcida.

Por otro lado, solamente el 13,1% de los oocitos no fecundados luego de ICSI, mostraron ausencia de espermatozoides en su interior. Estos resultados concuerdan con lo publicado con anterioridad por distintos autores (16,7%, Lopes y col., 1998; 19%, Flaherty y col., 1995; 16%, Sakkas y col., 1996; 12,7%, Coco y col., 1998). Es posible que este hallazgo sea producto de una expulsión del espermatozoide por parte del oocito, a través del surco de inyección.

La presencia de *falla total de activación* oocitaria se evidenció por la ausencia de expulsión del segundo cuerpo polar y la presencia intacta de la placa metafásica de la primer meiosis del oocito. Conjuntamente con esta situación, se pudo evidenciar la presencia de material genético paterno y el flagelo del espermatozoide dentro del citoplasma del oocito. En cuanto al estado de condensación de la cromatina del espermatozoide se observaron dos situaciones: (i) presencia de cromosomas paternos rodeados por microtúbulos, situación que se denomina *condensación prematura de cromosomas* (PCC), (ii) presencia de un

espermatozoide con distintos grados de condensación del material nuclear desde "intacto" (mayor grado de condensación de la cromatina del espermatozoide, consecuencia de una falla de activación espermática) a descondensado en distintos grados.

Luego de ICSI, la falla total de activación oocitaria fue la principal causa de falla de fecundación (36,5%) que se ha podido evidenciar en este estudio. Swann y col. (1990) y Dozortzev y col. (1995) demostraron que los espermatozoides contienen un factor citosólico termosensible denominado oscilina, que cuando es inyectado en el oocito es capaz de provocar activación, incluso en ausencia de ADN paterno. La ausencia de este factor o quizá la ineficiente actividad del mismo en espermatozoides 'de mala calidad', como los utilizados en ICSI, explicaría al menos en parte, la falla de activación oocitaria observada. En casos de factor masculino severo se ha descripto una mayor tasa de fragmentación del ADN del espermatozoide y una tasa significativamente mayor de fragmentación en espermatozoides que fallaron en su descondensación, que aquéllos que no lo hicieron (Lopes y col., 1998). Los autores proponen una asociación entre tasa de fragmentación y pérdida de actividad de la mencionada oscilina que explicaría la falta de activación pos ICSI.

El alto porcentaje de oocitos que no se activan indica que la activación oocitaria a partir de ICSI se logra de manera anormal. La experiencia con ICSI muestra que el espermatozoide inyectado puede activar completamente e inducir oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ similares a las observadas durante la fertilización normal. Con este hecho se podría afirmar que en ausencia de interacción entre gametas, el *oscilador* derivado del espermatozoide podría ser suficiente para provocar activación. Es muy probable que el influjo de Ca^{2+} provocado por la inyección en sí pueda servir como auxiliar de esa falta de interacción entre superficies, mientras que es insuficiente para provocar activación oocitaria sin el espermatozoide (Tesarik, 1998).

Además de la inexistencia de interacción entre superficies y la disfunción en la primera señal de liberación de Ca^{2+} que ocurre con ICSI, existen dos tipos de anormalidades más severas: un inusual retraso en el comienzo de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por el espermatozoide y una sustitución de las oscilaciones de Ca^{2+} con un largo incremento de la concentración de Ca^{2+} interno no oscilatorio (Tesarik y Testart, 1994).

Por analogía con otras especies, esas anormalidades pueden ocasionar serios disturbios en el desarrollo. De hecho una señal de Ca^{2+} anormal puede provocar desarreglos en la expulsión del segundo cuerpo polar generando tres pronúcleos luego de ICSI. Más aún, una demora en la señal de activación oocitaria es probable que demore o genere una inactivación incompleta del MPF que ocasionaría fallas en la fertilización normal (condensación prematura de cromosomas, PCC) o anomalías en la anafase II, dando lugar a posteriores anormalidades cromosómicas en el embrión (Tesarik, 1995b).

Dentro del nivel de falla de activación se pudo observar que existió un evento denominado PCC. Esta situación fue descripta por Schmiady y col. (1986), quienes observaron una frecuencia del 14% en oocitos no fecundados luego de FIV y está caracterizada por la presencia de cromosomas del espermatozoide en oocitos maduros inseminados que no muestran pronúcleos. Induciendo PCC experimental mediante la fusión de células en interfase con núcleos en mitosis, Johnson y col. (1970) demostraron que la morfología de los cromosomas condensados prematuramente variaba de acuerdo al estado en el que se encontraba el núcleo de la célula en interfase en el momento de la fusión. La PCC de células en fase G1 eran cromátides simples, aquellas en fase S tenían aspecto pulverizado y aquellas en fase G2, luego de la síntesis de ADN, tenían aspecto de doble cromátides. En oocitos humanos, lo que se observa son cromátides prematuramente condensadas y no cromosomas, ya que la condensación de cromosomas ocurre antes de la fase S, que usualmente se lleva a cabo cuando ya se desarrolló el pronúcleo. El mecanismo de PCC es poco claro. Una posible explicación fue dada por Schmiady y col.(1986), en la que tratan de explicar las causas como dependientes de la detención permanente de los oocitos en MII, generando una falla de activación. La situación resulta de la continua presencia de factores citoplásmicos oocitarios que provocan una condensación prematura de cromosomas. Los altos niveles del MPF serían los responsables de la denominada 'inmadurez citoplásmica oocitaria' observada concomitantemente con PCC.

Una de las anomalías reportadas luego de ICSI, es el retraso en la activación oocitaria. Como consecuencia, el núcleo masculino puede estar expuesto por algún tiempo al MPF no inactivado. Se sabe que un corto tiempo inicial de exposición al MPF es necesario para la ruptura de la membrana nuclear del espermatozoide, pero que el desarrollo subsiguiente del pronúcleo es un evento MPF independiente. Esta observación pone de manifiesto la importancia de una fina coordinación entre la exposición del núcleo masculino a factores citosólicos y la progresión de la activación oocitaria.

El 0,7% de activación abortiva observado ocasionalmente por inmunofluorescencia indicó que este evento podría ser un indicio de la existencia de un estadio, aún no descripto en humanos, que genera la formación de una tercera placa metafásica y la imposibilidad de salir de metafase y progresar hacia interfase como había sido descripto previamente en ratón (Kubiak, 1989). La única manera de corroborar este hallazgo fue realizar un estudio citogenético (Tarkowski) de oocitos provenientes de FIV e ICSI, que mostraron dos cuerpos polares sin visualización de pronúcleos. Nuestra hipótesis se confirmó cuando se pudo evidenciar que existe un 17,5% de oocitos sufren activación abortiva luego de ICSI, con la formación de distintas variantes (Metafase III, Núcleo Reticular, Núcleo en Telofase). Así mismo, se detectó un 8,2% de incidencia de esta categoría luego de FIV.

En este trabajo, se evidencian similares resultados si se compara el porcentaje de oocitos que fallaron en los procesos de migración/ pronucleación en ambos grupos. Una posible explicación ante la falla de aposición de pronúcleos es una dificultad en el ensamblaje de microtúbulos alrededor del centrosoma paterno que nucleará las tubulinas paternas y maternas. Las γ tubulinas maternas están uniformemente localizadas en la corteza celular y están contenidas también en una partícula de 25 S llamada 'γ some'. La atracción de las γ tubulinas hacia el centrosoma paterno puede estar dada por sitios de ligadura específicos así como también por proteínas motoras. Esta movilidad de componentes maternos hacia el centrosoma paterno dirige el alargamiento del áster espermático en humanos (Schatten y col., 1994); este crecimiento es permanente a medida que se continúa atrayendo gama tubulinas y otras proteínas maternas. Mientras el áster espermático se alarga, mueve al pronúcleo masculino (que se está descondensando) hacia el centro del oocito. Cuando los microtúbulos se ensamblan y establecen contacto con el pronúcleo femenino, comienza la migración de este último para posteriormente unirse en el centro de la célula. La incorrecta formación del áster, desarrollo de pronúcleos, formación del huso y división celular también han sido asociadas, al menos en parte, con el desarreglo del sistema de señalización del Ca^{2+}.

Un 18,5% de los oocitos que fallaron en la fecundación luego de ICSI, mostraron una detención en la primera placa metafásica. Este evento podría ser reflejo de un mayor nivel de 'desarreglo' de la activación oocitaria, proceso en el cual están implicadas las oscilaciones de Ca^{2+} intracitoplásmicos, como ya ha sido discutido anteriormente.
Ello conduce a una gama más amplia de alteraciones del primer ciclo celular si se compara con FIV en donde se observó una incidencia del 3,8% en el grupo estudiado ya que la mayor causa de falla de fecundación en FIV está supeditada al reconocimiento primario de gametas.

Dentro de la categoría "otros", uno de los ejemplos detectados en baja proporción es la penetración de dos espermatozoides (*dispermia)*, situación en la que se visualizan dos grupos de ADN espermático y la presencia de dos flagelos. Otra situación muy peculiar es el *despegado de cola del espermatozoide*. Esta situación trae como consecuencia la falla en la fecundación ya que no se reclutaran los microtúbulos a partir del centro organizador de microtúbulos situado en la base de la cabeza del espermatozoide. En esta causa de falla de fecundación se puede evidenciar la presencia de material genético paterno separado del flagelo espermático. Otra situación dentro de esta categoría es la alteración de la placa metafásica del oocito debida a una interferencia por parte del espermatozoide. Esta situación puede ser producto de la técnica de ICSI y la dimos a llamar inyección sobre MII o puede ser un error durante el proceso de fecundación luego de FIV (asociación en MII). Hewiston y col, (1999) trataron de explicar algunos eventos celulares involucrados luego de ICSI, para lo cual

utilizaron el modelo de monos *Rhesus* como principal aproximación. A partir de las observaciones luego de la realización de inmunofluorescencia para la detección de distintos epitopes y luego de ICSI en *Monos Rhesus*, los autores notaron que el huso meiótico podía estar desplazado con respecto a la posición del primer cuerpo polar. Clásicamente la región del huso meiótico se evita durante el procedimiento de ICSI alineando al primer cuerpo polar en ángulo recto con respecto al sitio de inyección y se asume que el huso está cercano al cuerpo polar. Los autores sin embargo, inyectando tubulina marcada de cerebro bovino en oocitos de monos *Rhesus*, observaron que el primer cuerpo polar puede ser desplazado en el rango de 0-68° desde la posición cortical del huso meiótico, mientras que en oocitos humanos madurados in vitro este valor era de 5,6- 20,7°, y para fallas de fecundación in vitro era de 2,7-21,9°. Para oocitos que son sometidos a ICSI (en donde la remoción de las células del cúmulus es un paso primordial), el rango se encontró entre 22,9-94,9°. Una posible explicación de este hecho es que el primer cuerpo polar (que no se encuentra firmemente asociado al oocito) migre lateralmente y no sea un buen indicador de la posición del huso meiótico.

Teniendo en cuenta que con la metodología de Tarkowski se estudió una población seleccionada previamente (dos cuerpos polares sin visualización de pronúcleos), el grupo de oocitos con distinto grado de descondensación del material genético masculino (Tabla VI) se vio incrementado luego de FIV e ICSI. Los oocitos expulsan sus cuerpos polares pero luego por alguna razón no logran finalizar el complejo mecanismo de activación oocitaria, probablemente por desarreglos en el ritmo de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$.

FECUNDACIÓN ANORMAL

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de mecanismos diferentes en el origen de la fecundación anormal luego de FIV e ICSI. La proporción de oocitos fecundados anormalmente luego de FIV e ICSI es comparable a la detectada por otros autores que estudiaron un numero mayor de oocitos con estas irregularidades (Sultán y col., 1995). En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos:

Cigotos fecundados anormalmente luego de FIV e ICSI. Comparación de resultados

	FIV		ICSI	
	1PN	≥3PNs	1PN	≥3PNs
Resultados propios	19 (22,6%)	65 (77,4%)	45 (65,2%)	24 (34,8%)
Sultan y col. (1995)	241 (26%)	675 (74%)	158 (66%)	82 (34%)

PN: Pronúcleo, PNs: Pronúcleos. En la categoría ≥3PN se incluyeron los oocitos fecundados con ≥3PNs y subnúcleos

La formación de cigotos **monopronucleados** es significativamente superior en ICSI respecto de FIV (Tabla VII), hecho previamente observado (Palermo y col., 1993 y Van Steirteghem y col., 1993a,b). Esta elevada proporción de cigotos monopronucleados luego de ICSI, indicaría una activación incorrecta e incapaz de dirigir un desarrollo pronuclear apropiado. La intervención técnica en ICSI, actuaría como agente activador "fuerte" y podría suplir parcialmente las alteraciones de la oscilina propuesta por Tesarik (1998). Así, es más frecuente hallar cigotos monopronucleados con 2CPs y raro con 1 solo CP, producto de activación débil (Tabla VIII). Contrariamente, en FIV, la activación queda sujeta a la interacción in vitro oocito-espermatozoide y como tal la formación de 1PN con 1 o 2 CPs se manifiestan como sucesos equiprobables (Tabla VIII).

En nuestro grupo de estudio, la formación de un pronúcleo y un CP representa el 10,7% de los casos luego de FIV y el 10,1% luego de ICSI. La ausencia del espermatozoide en estos casos nos indicaría la presencia de un evento partenogenético cuyo estimulo activador fue la inyección oocitaria. Por otro lado, la presencia de espermatozoide no descondensado en el interior del citoplasma nos hablaría, tal vez, de un evento ginogenético con un número diploide de cromosomas (2n), o un androgenon en el caso de un espermatozoide descondensado formando pronúcleo.

La formación de un pronúcleo conjuntamente con la expulsión del segundo cuerpo polar se identificó en 11,9% de los casos luego de FIV en contraposición al 55,1% de los casos observados luego de ICSI. La ausencia del espermatozoide en estos casos nos indicaría la presencia de un evento partenogenético con un número haploide de cromosomas (n). Por otro lado, la presencia de un espermatozoide no descondensado en el interior del citoplasma nos hablaría, tal vez, de un evento ginogenético con un número haploide de cromosomas (n).

Levron y col. (1995) sugirieron que los cigotos con un pronúcleo y dos CPs provenientes de FIV tienen su origen en la fusión del material genético paterno y materno. Los autores

estudiaron 16 cigotos con 1PN/2CPs y observaron que 6 de ellos eran diploides (~ 37,5% de los oocitos monopronucleados estudiados luego de FIV).
Cuando el espermatozoide formó un pronúcleo (+d), se observó un tamaño anormal (grande) del mismo como si se tratara en realidad de la fusión de dos pronúcleos. Este hecho nos permite hipotetizar que el desarrollo de los dos pronúcleos ocurrió más temprano que el momento de la revisión de la fecundación en el laboratorio y se los clasificó como ´anormales´ cuando en realidad había ocurrido una unión de los mismos. En este grupo también se observó 1PN masculino (tamaño normal) junto con material nuclear femenino condensado que no había formado pronúcleo todavía, lo cual indicaría que estamos en presencia de una desincronización en la formación de los pronúcleos masculino y femenino.

La formación de cigotos **multipronucleados** (3 y 4 PNs) luego de FIV es la más común; particularmente la formación de triploides diándricos producto de fertilizaciones dispérmicas. La triploidía digínica es menos frecuente y muy probablemente sea la consecuencia de una activación no totalmente exitosa que retiene el producto de la segunda división meiótica (2do CP) en el ooplasma. En ICSI, esta última situación, como es de esperar, es la causa más frecuente de formación de cigotos tripronucleados (Tabla IX).
La formación de tres pronúcleos con la expulsión de un cuerpo polar se registró en el 22,6% (n=19) de los casos luego de FIV y en el 23,2% (n=16) luego de ICSI. Los cigotos con este patrón de fertilización (3PN, 1CP) se pueden clasificar como triploides digínicos (3n).
El desarrollo de tres pronúcleos con la expulsión de dos cuerpos polares es el evento más frecuente luego de FIV (45,3% de los oocitos fecundados anormalmente estudiados), y ocurre en el 8,7% de los casos luego de ICSI. Dentro de esta categoría, la presencia de un espermatozoide no descondensado dentro del citoplasma oocitario ocurre en el 17,9% de los cigotos estudiados luego de FIV y en el 8,7% luego de ICSI. En 1996 Macas y col. mostraron la ocurrencia de desarrollo de 3PNs/2CPs en 3 de 18 oocitos con tres pronúcleos estudiados luego de ICSI (~ 16,5% de los oocitos multipronucleados estudiados luego de ICSI), hecho que lleva a pensar primeramente que se trata de una fecundación dispérmica. El análisis citogenético de estos cigotos, sugirió que el origen más probable de los 3PNs/2CP provenientes de ICSI deriva de la formación de dos pronúcleos que se han formado luego de la separación de varios cromosomas desde el complemento cromosómico femenino en anafase tardía o telofase temprana. Cuando se realizó el cariotipado de esos cigotos, los mismos poseían 1 pronúcleo haploide y dos pronúcleos hipohaploides cuya suma de cromosomas generó exactamente 23. Luego de FIV el más posible mecanismo de ocurrencia de 3PNs/2CPs es la fecundación dispérmica.

Por último, cabe mencionar que la formación de cariomeras o cigotos **subnucleados** no parece estar influida por la técnica de fertilización empleada. Mas aún, su ocurrencia es baja (6% y ~3%) y semejante en FIV e ICSI respectivamente, indicando que su origen es más inherente a factores oocitarios o del citoesqueleto, que a alteraciones del ritmo de la activación propiamente dicha. La ocasional formación de subnúcleos en vez de uno o dos núcleos haploides o un pronúcleo diploide también fue hallada en material partenogenético como causa directa del daño provocado al citoesqueleto por el estímulo activador (Austin, 1969).

En el presente trabajo se analizaron los eventos celulares involucrados en la aparición de dos fenómenos frecuentes que caracterizan la detención precoz del desarrollo embrionario en humanos: la falla de fecundación y la fecundación anormal. Se demostró que en algunos casos existieron alteraciones de la dinámica de reorganización citoesqueletaria (tubulinas), organización del ADN pronuclear materno y paterno, organización del aster, y activaciones abortivas de manifestación citológica. Este origen de la alteración del desarrollo no dependió necesariamente de desbalances cromosómicos, aunque estos pudieron tener lugar al mismo tiempo.

Alfredo Vitullo

VANESA RAWE

LOS RESULTADOS PARCIALES Y TOTALES DE LA PRESENTE TESIS FUERON COMUNICADOS EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS:

- Organización del citoesqueleto y activación abortiva en oocitos humanos durante las fallas de fecundación. (Sociedad Argentina de Investigación Clínica, SAIC, Mar del Plata, Noviembre, 1998).

- Reproducción asistida del Siglo XXI, México, Enero, 1999.

- Fertilization Failures: How do we handle the problem clinically. Andrology in the Nineties, Sudáfrica, Marzo, 1999.

- Rawe V., Brugo Olmedo S., Nodar F., Doncel G., Vitullo A., Chillik C., Acosta A. 'Alteración de Mecanismos Moleculares y Activación Abortiva en Oocitos Humanos Durante las Fallas de Fecundación', Reunión Mensual de la Sociedad Argentina de Esterilidad y Fertilidad, Buenos Aires, Mayo, 1999.

- Cytoskeletal organization and chromatin configuration in abnormally fertilized human oocytes (American Society of Reproductive Medicine, ASRM, Septiembre, 1999).

- Vanesa Rawe, Santiago Brugo Olmedo, Florencia Nodar, y Alfredo Vitullo. Patrones de Fertilización Anormal en Oocitos Humanos (Sociedad Argentina de Investigación Clínica, SAIC, Mar del Plata, Noviembre, 1999).

- V. Rawe. Falla de fertilización: descripción celular por inmunofluorescencia. 10º Congreso Argentino de Esterilidad, Fertilidad y Medicina Reproductiva, Mayo, 2000.

PREMIOS OBTENIDOS

Vanesa Rawe, Santiago Brugo Olmedo, Florencia Nodar, Gustavo Doncel, Alfredo Vitullo, Claudio Chillik, Aníbal Acosta. Alteración de Mecanismos Moleculares y Activación Abortiva en Oocitos Humanos durante las Fallas de Fecundación - Aspectos Biológicos –

Premio SERONO, (Sociedad Argentina de Esterilidad y Fertilidad, SAEF, 1998).

LOS RESULTADOS PARCIALES Y TOTALES DE LA PRESENTE TESIS FUERON PUBLICADOS EN LAS SIGUIENTES REVISTAS:

- Rawe V., Nodar F., Vitullo A. Failed fertilization after IVF and ICSI. *Alpha*, 5, 1999.

- Rawe V., Brugo Olmedo S., Nodar F., Doncel G., Vitullo A., Chillik C., Acosta A. Alteración de Mecanismos Moleculares y Activación Abortiva en Oocitos Humanos durante las Fallas de Fecundación. Aspectos Biológicos. *Reproducción*, 4 (1):19-29, 1999.

- Calamera J., Nodar F., Rawe V., Acosta A. (1999) Role of sperm function and sperm test. In: Assisted reproduction, Indira Hinduja Eds., Oxford University Press.

- Vanesa Rawe, Florencia Nodar, Santiago Brugo Olmedo, Alfredo Vitullo. Patrones de fertilización anormal en oocitos humanos: análisis inmunocitoquímico con fluorescencia *Revista de Medicina Reproductiva*, vol. 2 (3): 143-147, 1999.

- Rawe V., Brugo Olmedo S., Nodar F., Doncel, G., Vitullo A., Acosta A. Cytoskeletal organisation defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 6: 510- 516, 2000.

- Rawe, V.Y., Brugo Olmedo, S., Nodar, F.N., Galaverna, G.D. and Vitullo, A.D. Microtubules and parental genomes organisation during abnormal fertilisation in humans. *Zygote,* 00:00-00, enviado.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a:

Mi director de tesis, el Dr. Alfredo Vitullo, por haber sido un guía invalorable durante este difícil camino.

Al Dr. Gustavo Doncel y el Dr. Aníbal Acosta sin cuyo empuje y determinación no hubiera iniciado mi trabajo doctoral.

Al Dr. Brugo Olmedo y la Lic. Florencia Nodar por la inmensa confianza que depositaron en mi trabajo.

Al Lic. Germán Galaverna, con quien desarrollé día a día todo el trabajo experimental en el laboratorio.

A la Lic. De Vincentiis, Lic. Felicitas Noblía, Lic. Martínez y Lic. Valcarcel por su colaboración desinteresada en la obtención del material estudiado.

A los directivos del CEGyR; Dr. Chillik, Dr. Papier, Dr. Fiszbajn y Dr. Borghi.

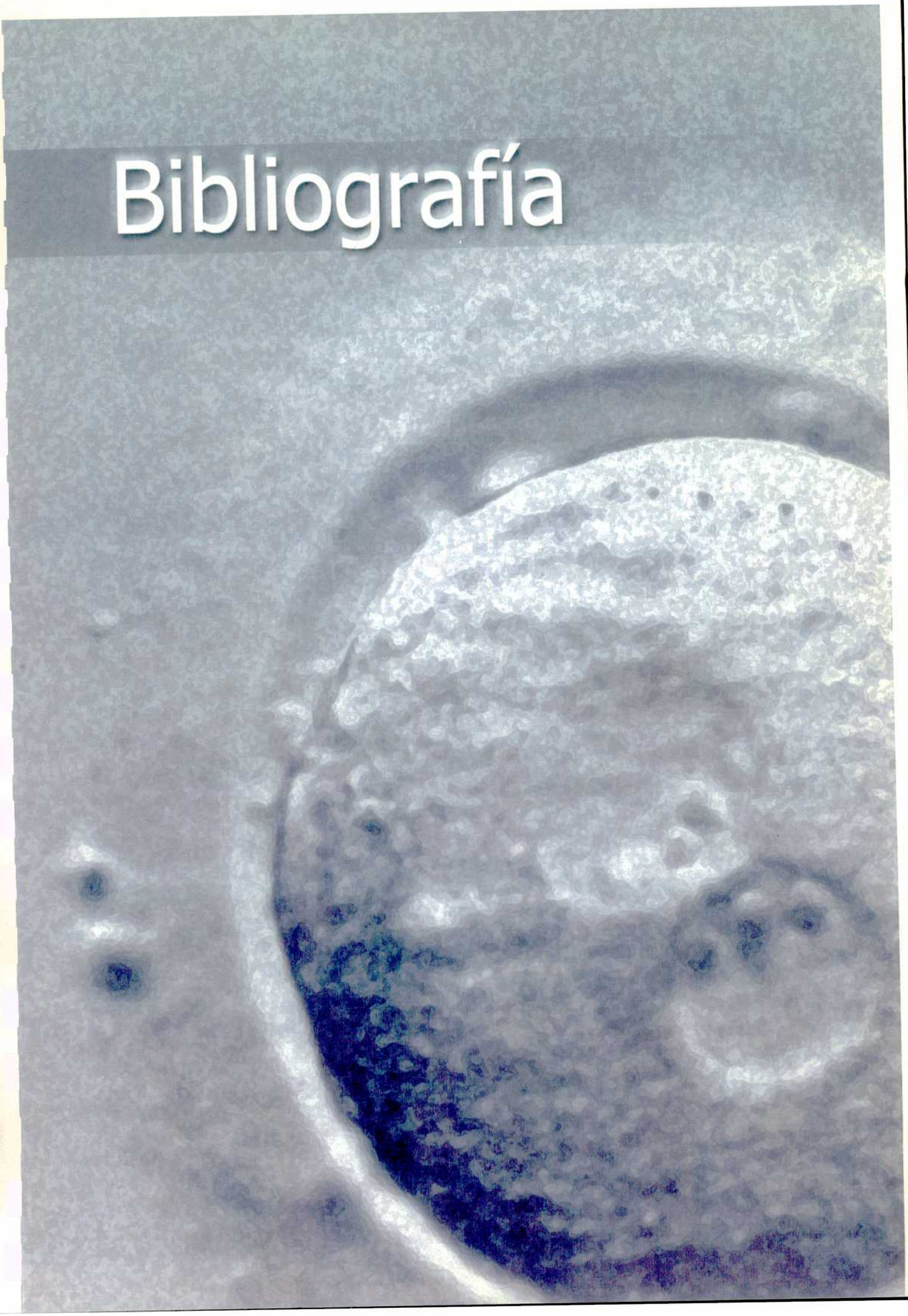
A la Asociación CEGyR, y su presidenta, la Sra. Coca Nodar, por toda la inversión y el apoyo que realizó durante estos años para mi crecimiento profesional.

A la Dra. Adriana Grabia por su constante interés, amistad y consejos.

A mi madre, quien me acompañó y apoyó incondicionalmente en todo momento.

A mi padre, amigos, primas, abuela, hermano y tíos que me dieron la fuerza necesaria.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

Abramczuk J.W. y Lopata, A. (1990). Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained in vitro. Hum. Reprod., 5, 578-581.

Agell, N., y Mezquita, C. (1988). Cellular content of ubiquitin and formation of ubiquitin conjugates during chicken spermatogenesis. Biochem. J. 250, 883-889.

Almeida, E. A., Huovila, A. P., Sutherly, A. E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., Sonnenberg, A,. Primakoff, P., y Myles, D. G. (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. Cell 81, 1095-1104.

Asch, R., Simerly, C. S., Ord, T., Ord, V. A., y Schatten, G. (1995). The stages at which human fertilization arrests: Microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which fail to complete fertilization and development in humans. Human Reprod. 10, 1897-1906.

Austin, C. R. (1961). "The mammalian egg." Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Austin, C.R. (1969). Variations and anomalies in fertilization. In Fertilization , vol.2, ed. C.B. Metz and Monroy, pp 437-66. New York: Academic Press.

Austin, C.R. y Braden, A.W.H. (1954). Induction and inhibition of the second polar division in the rat egg and subsequent fertilization. Aust. J. Biol. Sci , 7, 195-210.

Bacetti, B., Renieri, T., Rosati, F., Selmi, M. G., y Casanova, S. (1997). Further observations on the morphogenesis of the round-headed human spermatozoa. Andrologia 9, 255-264.

Balakier, H. (1993). Tripronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development. Hum. Reprod., 8, 1892-1897.

Barnett, D. K., Kimura, J., y Bavister, B. D. (1996). Translocation of active mitochondria during hamster preimplantation embryo development studied by confocal laser scanning microscopy. Dev. Dyn. 205, 64-72.

Barros, C., Crosby, J. A., y Moreno, R. D. (1996). Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. Cell Biol. Int. 20, 33-39.

Barth, A. D., y Oko, R. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa, Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Battaglia, D. E., Koehler, J. K., Klein, N. A., y Tucker, M.J. (1997). Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. Fertil. Steril. 68, 118-122.

Bedford, J. M. (1968). Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in rabbit. Amer. J. Anat. 123, 329-358.

Bedford, J. M. (1979). Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In "The spermatozoon." (D. W. Fawcett y J. M. Bedford, Eds), pp. 7-21. Urban and Schwarzenberg Inc., Baltimore-Munich.

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

Bellvé, A. R., Chyrika, R., Martinova, Y. S., y Barth, A. H. (1992). The perinuclear matrix as a structural element of the mouse sperm nucleus. Biol. Reprod. 47, 451-465.

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

Berndtston, W. E., y Desjardins, C. (1974). The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. Am. J. Anat. 140, 187-178.

Birky, Jr., C. W. (1995). Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: Mechanisms and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11331-11338.

Bleil, J. D., y Wassarman, P. M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev. Biol. 95, 317-324.

Blobel, C. P., Wolfsberg, T. G., Turck, C. W., Myles, D. G., Primakoff, P., y White, J. M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature 356, 248-252.

Boman, A. L., Delannoy, M. R., y Wilson, K. L. (1992). GTP hydrolysis is required for vesicle fusion during nuclear envelope assembly in vitro. J. Cell Biol. 116, 281-294.

Bouckson-Castaing, V., Moudjou, M., Ferguson, D. J., Mucklow, S., Belkaid, Y., Milon, G., y Crocker, P. R. (1996). Molecular characterisation of dinein, a new coiled-coil protein of the centrosome. J. Cell Sci. 109, 179-190.

Bourgain, C., Nagy, Z. P., De Zutter, H., Van Ranst, H., Noguiera, D., y Van Steirteghem, A. C. (1998). Ultrastructure of gametes after intracytoplasmic sperm injection. In "Current Theory and Practice of ICSI." (P. Devroey, B. C. Tarlatzis, y A. Van Steirteghem, Eds.), Hum. Reprod. 13, Suppl. 1, 107-115.

Boveri, T. (1901). "Zellen-studien: Über die nature der centrosomen." IV Fisher, Jena, Germany.

Bowen, R. H. (1922). On the idiosome, Golgi apparatus and acrosome in the male germ cell. Anat. Rec. 24, 158-180.

Braden, A.W.H. (1957). Variations between strains in the incidence of various abnormalities of egg maturation and fertilization in mouse. J. Genet., 55, 476-86.

Bronson, R.A., y Fusi, F. (1990). Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. Biol. Reprod. 43, 1019-1025.

Burks, D. J., Carballada, R., Moore, H. D., y Saling, P. M. (1995). Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. Science 269, 83-86.

Calvin, H. I., y Bedford, J. M. (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod Fertil. Suppl., 13, 65-75.

Capmany, G., Taylor, A., Braude, P., Bolton, V. (1996). The timing of pronclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1- cell embryo. Mol. Hum. Reprod., 5, 299-306.

Carrera, A., Gerton, G. L., y Moss, S. B. (1994). The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: Structural and functional similarities to the A-Kinase Anchoring Protein. Dev. Biol. 165, 272-284.

Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D. K., y Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. Science 243, 1576-1583.

Chian, R. C., Tan, S. L., y Sirard, M. A. (1999). Protein phosphorylation is essential for formation of male pronucleus in bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev. 52, 43-49.

Cho, C., O'Dell Bunch, D., Faure, J.-E., Goulding, E. H., Eddy, E. M., Primakoff, P., y Myles, D. G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β. Science 281, 1857-1859.

Cho, C., Primakoff, P., White, J. M., y Myles, D. G. (1996). Chromosomal assignment of four testis-expressed mouse genes from a new family of transmembrane proteins (ADAMs) involved in cell-cell adhesion and fusion. Genomics 34, 413-417.

Cho, C., Turner, L., Primakoff, P., y Myles, D. G. (1997). Genomic organization of the mouse fertilin beta gene that encodes an ADAM family protein active in sperm-egg fusion. Dev. Genet. 20, 320-832.

Clermont, Y. (1969). Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (Cercopithecus aethiops). Am. J. Anat. 126, 57-72.

Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52, 198-236.

Cohen, D. J., Munuce, M. J., y Cuasnicu, P. S. (1996). Mammalian sperm-egg fusion: the development of rat oolemma fusibility during oogenesis involves the appearance of binding sites for sperm protein "DE". Biol. Reprod. 55, 200-206.

Collas, P., Courvalin, J.-C., y Poccia, D. (1996). Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a lamin B receptor-like integral membrane protein. J. Cell Biol. 135, 1715-1725.

Collas, P., Fissore, R., Robl, J.M. y col. (1993). Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. Mol. Reprod. Dev., 34, 212-223.

Colleu, D., Lescoat, D., Thomas, D., y Gouranton, J. (1997). Changes in protamine 1 distribution in human sperm nucleus during in vitro sperm-oocyte interaction: an immunoelectron microscopic study. Fertil. Steril. 67, 123-128.

Coonrod, S. A., Herr, J. C., y Westhusin, M. E. (1996). Inhibition of bovine fertilization in vitro by antibodies to SP-10. J. Reprod. Fertil. 107, 287-297.

Courtens, J. L., Courot, M., y Flechon, J. E. (1976). The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. J. Ultrastruct. Res. 57, 54-64.

Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H., y Reid, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. Science 267, 1353-1356.

Crozet, N. (1990). Behavior of sperm centriole during sheep fertilization. Eur. J. Cell Biol. 53, 326—332.

Cummins, J. M., Wakayma, T., y Yanagimachi, R. (1998). Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. Zygote 6, 213-222.

Doxsey, S. J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P. D., y Kirschner, M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. Cell 76, 639-650.

Dozortsev, D., Rybouchkin, A. y DeSutter, P. (1995). Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection; the role of the sperm cell. Hum. Reprod., 9, 2139-2144.

Ecklund, P. S., y Levine, L. (1975). Mouse sperm basic nuclear protein: electrophoretic characterization and fate after fertilization. J. Cell Biol. 66, 251-262.

Edwards, R.G. (1958a). Colchicine- induced heteroploidy in the mouse I. The induction of triploidy by treatment of the gametes. J. Exp. Zool., 137, 317-48.

Edwards, R.G. (1958b). The experimental induction of gynogenesis in the mouse. III. Treatment of spermatozoa with trypaflavine, toluidine blue, or nitrogen mustard. Proc. R. Soc. Lond. .B., 149, 117-29.

Escalier, D. (1990). Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round- headed human spermatozoa. Int. J. Dev. Biol. 34, 287-297.

Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. Dev. Biol. 44, 394-436.

Fechter, J., Schöneberg, A., y Schatten, G. (1996). The excision and disassembly of sperm tail microtubules during sea urchin fertilization: requirements for microtubule dynamics. Cell Motil. Cytoskel. 35, 281-288.

Flaherty, S.P., Payne, D., Swann, N.J. y col. (1995). Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 10, 2623-2629.

Florman, H. M., y Wassarman, P. M. (1985). O-linked oligosachanides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell 41, 313-24.

Fouquet , J. P., Kann, M. L., y Melki, R. (1998). γ-tubulin during the differentiation of spermatozoa in various mammals and man. Mol. Hum. Reprod. 4, 1122-1129.

Freemerman, A. J., Wright, R. M., Flickinger, C. J., y Herr, J. C. (1994). Tissue specificity of the acrosomal protein SP-10: a contraceptive vaccine candidate molecule. Biol. Reprod. 50, 615-621.

Fukasawa, K., Choi ,T., Kuriyama, R., Rulong, S., y Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. Science 271, 1744-1747.

Fulka Jr., J., Horska, M., Moor, R. M., Fulka, J., y Kanka, J. (1996). Oocyte-specific modulation of female pronuclear development in mice. Dev. Biol. 178, 1-12.

Fusi, F. M., Bernocchi, N., Ferrari, A., y Bronson, R. A. (1996). Is vitronectin the velcro that binds the gametes together? Mol. Hum. Reprod. 2, 859-866.

Gabel, C. A., Eddy, E. M., y Shapiro, B. M. (1979). After fertilization, sperm surface components remain as a patch in sea urchin and mouse embryos. Cell 18, 207-215.

Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., y Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77, 6715-6719.

Gong, X., Dubois, D. H., Miller, D. J., y Shur, B. D. (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. Science 269, 1718-1721.

Gook, D., Osborn, S.M., Bourne, H. y col. (1998). Fluorescent study of apparently unfertilized human oocytes following ICSI. Mol. Hum. Reprod., 12, 1130-1135.

Gould, R. R., y Borisy, G. G. (1977). The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. J. Cell Biol. 73, 601-615.

Gundersen, G. G., Medill, L., y Shapiro, B. M. (1986). Sperm surface proteins are incorporated into egg membrane and cytoplasm after fertilization. Dev. Biol. 113, 207-217.

Gupta, S. K., Alves, K., Palladino, L. O., Mark, G. E., y Hollis, G. F. (1996). Molecular cloning of the human fertilin beta subunit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 318-326.

Hardy, C. M., y Holly, M. K. (1996). Cloning and expression of recombinant rabbit fertilin. Mol. Reprod. Dev. 45, 107-116.

Herrada, G., y Wolgemuth D. J. (1997). The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. J. Cell Sci. 110, 1543-1553.

Hertig, A. T., y Adams, E. (1967). Studies on the human oocyte and its follicle. Ultrastructural and cytochemical observations on the primordial follicle. J. Cell Biol. 34, 647-675

Hewitson, L., Dominko, T., Takahashi, D. y col. (1999). Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. Nature Medicine, 4, 431-433.

Hewitson, L., Dominko, T., Takahashi, D., Simerly, C., Santos, J., Sutovsky, P., Jacobs, D., Monteih, D., Fanton, J., Neuringer, M., Battaglia, D., y Schatten, G. (1999). Births of ICSI monkeys reveal checkpoints unique to the first cell cycle of fertilization. Nature Med.

Hewitson, L.C., Simerly, C. R., Tengowski, M. W., Sutovsky, P., Navara, C. S., Haavisto, A. J., y Schatten, G. (1996). Microtubule and DNA configurations during Rhesus intracytoplasmic sperm injection: successes and failures. Biol. Reprod. 55, 271-280.

Jaffe, L. F. (1980). Calcium explosions as triggers of development. Ann. N. Y. Acad. Sci. 339, 86-101.

Jaffe, L.A. (1990). First messengers at fertilization. J. Reprod. Fertil. Suppl., 42, 107-116.

Ji, Y. Z., Wolf, J. P., Jouannet, P., y Bomsel, M. (1998). Human gamete fusion can bypass beta1 integrin requirement. Hum. Reprod. 13, 682-689.

Jones, K. T., Soeller, C. y Cannell, M. B. (1998). The passage of Ca^{2+} and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. Development 125, 4627-4635.

Jones, K. T., y Whittingham, D. G. (1996). A comparison of sperm-and IP3-induced Ca^{2+} release in activated and aging mouse oocytes. Dev. Biol., 178, 229-237.

Jones, R. (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. Development 111, 1155-1163.

Joshi, H. C. (1993). γ-tubulin: the hub of cellular microtubule assemblies. BioEssays 15, 637-643.

Joswig, G., Petzelt, C., y Werner, D. (1991). Murine cDNAs coding for the centrosomal antigen centrosomin A. J. Cell Sci. 98, 37-43.

Kalab, P., Visconti, P., Leclerc, P., y Kopf, G.S. (1994). p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. J. Biol. Chem. 269, 3810-3817.

Kalnins, V. I., y Rogers, K. A. (1992). The centrosome in stationary and migrating endothelial cells. In "The Centrosome" (Kalnins, V. I., Ed.), pp. 287-312. Academic Press. Inc., New York.

Kao, S.-H., Chao, H.-T., y Wei, Y.-H. (1995). Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. Biol. Reprod. 52, 729-736.

Kaufman, M. (1983). Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Kim, N.-H., Simerly, C., Funahashi, H., Schatten, G., y Day, B. N. (1996). Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. Biol. Reprod. 54, 1397-1404.

Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Perry, A. C. F., y Yanagimachi, H. (1998). Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. Biol. Reprod. 58, 1407-1415.

Komar, A. (1973). Parthenogenetic development of mouse eggs activated by heat- shock. J. Reprod. Fertil., 35, 433-43.

Kopecny, V., Flechon, J. E., Camous, S., y Fulka, J. Jr. (1989). Nucleologenesis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. Mol. Reprod. Dev. 1, 79-90.

Kopecny, V., y Pavlok, A. (1975). Incorporation of Arginine-3H into chromatin of mouse eggs shortly after sperm penetration. Histochemistry 45, 341-345.

Krukowska, A., Wielkopolska, E., Czolowska, R., Maleszewski, M., y Tarkowski, A. K. (1998). Mouse oocytes and parthenogenetic eggs lose the ability to be penetrated by spermatozoa after fusion with zygotes. Zygote 6, 321-328.

Krzanowska, H. (1982). Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. J. Reprod. Fert. 64, 97-101.

Kubiak JZ. (1989). Mouse oocytes gradually developed the capacity for activation during the metaphase II arrest. Dev. Biol., 136: 537-545.

Lalli, M., y Clermont, Y. (1981). Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. Am. J. Anat. 160, 419-434.

Laurincik, J., Hyttel, P., Baran, V., Eckert, J., Lucas-Hahn, A., Pivko, J., Niemann, H., Brem, G., y Schellyer, K. A. (1998). Detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes in vitro: cell-cycle chronology and ultrastructure. Mol. Reprod. Dev. 50, 192-199.

Lavoir, M. C., Kelk, D., Rumph, N., Barnes, F., Betteridge, K. J., y King, W. A. (1997). Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. Biol. Reprod. 57, 204-213.

Le Guen, P., y Crozet, N. (1989). Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. Eur. J. Cell Biol. 48, 239-249

Lestienne, P., Reynier, P., Chretien, M.-F., Penisson-Besnier, I., Malthiery, Y., y Rohmer, V. (1997). Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. Mol. Hum. Rep. 3, 811-814.

Levron, J., Munne, S., Willadsen, S., Rosenwaks Z., Cohen, J. (1995). Male and Female genomes Associated in a Single Pronucleus in Human Zygotes. Biol. Reprod., 52, 653-657.

Lin, P., y Clarke, H. J. (1996). Somatic histone H1 microinjected into fertilized mouse eggs is transported into the pronuclei but does not disrupt subsequent preimplantation development. Mol. Reprod. Dev. 44, 185-192.

Liu, D.Y., Baker, H.W. (2000). Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. Hum. Reprod. 3, 702-708.

Long, C. R., Duncan, R. P., y Robl, J. M. (1997). Isolation and characterization of MPM-2-reactive sperm proteins: Homology to components of the outer dense fibers and segmented columns. Biol. Reprod. 57, 246-254.

Long, C. R., Pinto-Correia, C., Duby, R. T., Ponce de Leon, A., Boly, M. P., Roche, J. F., y Robl, J. M. (1993). Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes. Mol. Reprod. Dev. 36, 23-32.

Longo, F. J. (1976). Sperm aster in rabbit zygotes: its structure and function. J. Cell Biol. 69, 539-547.

Longo, F.J. (1973). Fertilization: a comparative ultrastructural review. Biol. Reprod., 9, 149-215.

Lopes, S., Juriscova, A., Casper R. y col. (1998). Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 13, 703-708.

Macas, E., Imthurn, B., Rosselli, M., Keller, P. (1996). The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 11, 2496-2501

Macaulay, C., y Forbes, D. J. (1996). Assembly of the nuclear pore: Biochemically distinct steps revealed with NEM, GTPgS, and BAPTA. J. Cell Biol. 132, 5-20

Manandhar, G., Sutovsky, P., Joshi, H. C., Stearns, T., y Schatten, G. (1998). Centrosome reduction during mouse spermiogenesis. Dev. Biol. 203, 424-434.

Masui, Y. (1982). Oscillatory activity of maturation promoting factor (MPF) in extracts of Rana pipiens eggs. J. Exp. Zool. 24, 389-399.

Masui, Y., y Clarke, H. J. (1979). Oocyte maturation. Int. Rev. Cytol. 57, 185-282.

McLaughlin, E. A., Frayne, J., Barker, H. L., Jury, J. A., Jones, R., Ford, W. C., y Hall, L. (1997). Cloning and sequence analysis of rat fertilin alpha and beta-developmental expression, processing and immunolocalization. Mol. Hum. Reprod. 3, 801-809.

McNally, F. J., Okawa, K., Iwamatsu, A., y Vale, R. D. (1996). Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes. J. Cell Sci. 109: 561-567.

Meier, E., Miller, B. R., y Forbes, D. J. (1995). Nuclear pore complex assembly studied with a biochemical assay for annulate lamellae formation. J. Cell Biol. 129, 1459-1472.

Meister, A., y Yerson, M. E. (1983). Glutathione. Ann. Rev. Biochem. 52, 711-760.

Messinger, S.M. y Albertini, D.I. (1991). Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte. J. Cell. Sci., 100, 289-298.

Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. y Honda, H. (1993). Essential role of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscilations at fertilization in mammalian eggs. Dev. Biol., 158: 62-78.

Moos, J., Visconti, P. E., Moore, G. D., Schultz, R. M., y Kopf, G. S. (1995). Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. Biol. Reprod. 53, 692-699.

Moritz, M., Braunfeld, M. B., Fung, J. C., Sedat, J. W., Alberts, B., y Agard, D. A. (1995). Three-dimensional structural characterization of centrosomes from early Drosophila embryos. J. Cell Biol. 130, 1149-1159.

Munné, S., Tang, Y.X., Griffo, J. y col. (1993). Origin of single pronucleated human zygotes. J. Assit. Reprod. Genet., 10, 276-279.

Murray, A.W. y Kirschner, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature, 339, 275-280.

Myles, D. G., y Primakoff, P. (1997). Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. Biol. Reprod. 56, 320-327.

Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H., Devroey, P. y Van Steirteghem, A. (1994). Time course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 9, 1743-1748.

Navara, C. S., First, N. L., y Schatten, G. (1994). Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: The role of the sperm aster. Dev. Biol. 162: 29-40.

Navara, C. S., First, N. L., y Schatten, G. (1996a). Phenotypic variations among paternal centrosomes are expressed within the zygote as varied microtubule length and sperm aster organization: correlations between centrosome activity and developmental success. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5384-5388.

Navara, C.S., Hewitson, L., Simerly, C.R., Sutovsky, P., y Schatten, G. (1996b). The implications of a paternally derived centrosome during human fertilization: Consequences for reproduction and the treatment of male factor infertility. Am. J. Reprod. Immun. 37, 39-49.

Navara, C.S., Simerly, C., Compton, D. A., y Schatten, G. (1996c). Maternal NuMA is required for nuclear formation and aster organization during fertilization: NuMA reorganization is microtubule independent. Mol. Biol. Cell 7/Suppl, 208a.

Navara, C.S., Zoran, S. S., Salisbury, J. L., Simerly, C., Stearns, T., y Schatten, G. (1995). Recruitment of maternal γ-tubulin to the bovine sperm centrosome. Mol. Biol. Cell. 6/Suppl., 39a.

Newport, J. W. (1987). Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. Cell 48, 205-217.

Okabe, M., Nagira, M., Kawai, Y., Matzno, S., Mimura, T., y Mayumi, T. (1990). A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. Fertil. Steril. 54, 1121-1126.

Okabe, M., Yagasaki, M., Oda, H., Matzno, S., Kohama, Y., y Mimura, T. (1988). Effect of a monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. J. Reprod. Immunol. 13, 211-219.

Oko, R. (1995). Developmental expression y possible role of perinuclear theca proteins of mammalian spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. 7, 777-797.

Oko, R., y Clermont, Y. (1988). Isolation, structure and protein composition of the perforatorium of rat spermatozoa. Biol. Reprod. 39, 673-687.

Oko, R., y Clermont, Y. (1998). Spermiogenesis. In "Encyclopedia of Reproduction" (E Knobil y J. D. Neil, Eds.), Vol. IV., pp. 602-609. Academic Press Inc., San Diego.

Oko, R., y Maravei, D. (1995). Distribution and possible role of perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. Microsc. Res. Tech. 32, 520-532.

Ozil, J.P. (1998). Role of calcium oscillations in mammalian egg activation: experimental approach. Biophys. Chem., 72, 141-152.

Ozil, J.P. y Swann, K. (1995). Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. J. Physiol., 483, 331-346.

Palacios, M. J., Joshi, H. C., Simerly, C., y Schatten, G. (1993). γ-tubulin reorganization during mouse fertilization and early development. J. Cell Sci. 104, 383-389.

Palazzo, R. E., Vaisberg, E., Cole, R. W., y Rieder, C. L. (1992). Centriole duplication in lysates of Spisula solodissima oocytes. Science 256, 219-221.

Palermo, G., Joris, H., Derde, M. P. y col. (1993). Sperm charcteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 59, 826-835.

Panté, N., y Aebi, U. (1996). Sequential binding of import ligands to distinct nuclear pore regions during their nuclear import. Science 273, 1729-1732.

Parrington, J., Swann, K., Schevchenko, V. I., Sesay, A. K., y Lai, F. A. (1996). Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm factor. Nature 379, 364-368.

Pasteels, J.J. (1963). Sur l'origine de la membrane nucléaire du pronucleus Ó chez le Mollusque Bivalve Barnea candida (Étude au microscopie électronique). In "Bulletin de l"Académie royale de Belgique (Classe de Sciences).", pp. 329-336.

Perreault, S. D., Wolf, R. A., y Zirkin, B. R. (1984). The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. Dev. Biol. 101, 160-167.

Perry, A. C., Gichuhi, P. M., Jones, R., y Hall, L. (1995). Cloning and analysis of monkey fertilin reveals novel alpha subunit isoforms. Biochem. J. 307, 843-850.

Pfaller, R., Smythe, C., y Newport, J. W. (1991). Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane: Cell cycle-dependent binding of nuclear membrane vesicles to chromatin in vitro. Cell 65, 209-217.

Pinto-Correia, C., Poccia, D. L., Chang, T., y Robl, J. M. (1994). Dephosphorylation of sperm midpiece antigens initiates aster formation in rabbit oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7894-7898.

Plachot, M., Crozet, N. (1992). Fertilization abnormalities in human in- vitro fertilization. Hum. Reprod., 7, suppl.1: 89-94.

Poccia, D., y Collas, P. (1996). Transforming sperm nuclei into male pronuclei in vivo and in vitro. In "Current Topics in Developmental Biology." (R. A. Pedersen, y G. P.Schatten, Eds) Vol. 34, pp. 25-88. Academic Press Inc., San Diego.

Primakoff, P., Hyatt, H., y Myles, D. G. (1985). A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. J. Cell Biol. 101:2239-44.

Ramarao, C. S., Myles, D. G., White, J. M., y Primakoff, P. (1996). Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilin beta subunit. Mol. Reprod. Dev. 43, 70-75.

Rankin, T. L., Tong, Z. B., Castle, P. E., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L. M., y Dean, J. (1998). Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. Development 125, 2415-2424.

Reinsch, S., y Gonczy, P. (1998). Mechanisms of nuclear positioning. J. Cell Sci. 111, 2283-2295.

Reynier, P., Chretien, M. F., Savagner, F., Larcher, G., Rohmer, V., Barriere, P., y Malthiery, Y. (1998). Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa y supports the bottleneck theory for oocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252, 373-377.

Riffo, M. S., y Parraga, M. (1997). Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. J. Exp. Zool. 279, 81-88.

Rochwerger, L., Cohen, D. J., y Cuasnicu, P. S. (1992). Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. Dev. Biol. 153, 83-90.

Royere, D., Hamamah, S., Nicolle, J.C. y col. (1988). Freezing and thawing after chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange and Feulgen- DNA cytophotometric studies. Gamete Res., 21: 51-57.

Rybouchkin, A, Dozortsev, D., Pelinck, M. J., De Sutter P., y Dhont, M. (1996). Analysis of oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. Hum. Reprod. 11, 2170-2175

Sadowy, S., Tomkin, G., Munne, S., Ferrara-Congedo, T., y Cohen, J. (1998). Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. Zygote 6, 137-141.

Sakkas, D., Urner, F., Bianchi, P.G. y col. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 11, 837-843.

Saling, P. M., Irons, G., y Waibel, R. (1985). Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. Biol. Reprod. 33, 515-526.

Sathananthan, A. H., Kola, I., Osborne, J., Trounson, A., Ng, S. C., Bongso, A., y Ratnam, S. S. (1991). Centrioles at the beginning of human development. Proc Natl Acad Sci USA 88, 4806-4810.

Sathananthan, A. H., Ratnam, S. S., Ng, S. C., Tarín, J. J., Gianaroli, L., y Trounson, A. (1996). The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. Hum. Reprod. 11, 345-356.

Sathananthan, A. H., Tatham, B., Dharmawardena, V., Grills, B., Lewis, I., y Trounson, A. (1997b). Inheritance of sperm centrioles and centrosomes in bovine embryos. Archives Yrol. 38, 37-48.

Schalles, U., Shao, X., Van der Hoorn, F. A., y Oko, R. (1998). Developmental expression of the 84 kDa ODF sperm protein: Localization to both the cortex and medulla of outer dense fibers and to the connecting piece. Dev. Biol., 199, 250-260.

Schatten, G., Simerly, C., y Schatten, H. (1985b). Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4152-4156.

Schatten, H., Schatten, G., Mazia, D., Balczon, R., y Simerly, C. (1986). Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 105-109.

Schatten, H., Simerly, C., Maul, G., y Schatten, G. (1989). Microtubule assembly is required for the formation of the pronuclei, nuclear lamin acquisition, and DNA synthesis during mouse, but not sea urchin, fertilization. Gamete Res. 23, 309-322.

Schatten, G. (1994). The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. Dev. Biol., 165, 299-335.

Schmiady, H., Sperling, K., Kentenich, H., y col. (1986). Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). Hum. Genet., 74, 441- 443.

Schultz, R. M., y Kopf, G. S. (1995). Molecular basis of mammalian egg activation. In "Current Topics in Developmental Biology."(R.A. Pedersen, y G. P. Schatten, Eds), Vol. 30, pp. 21-62. Academic Press Inc., San Diego.

Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K. J., Cole, N., Moreira, J. E., Terasaki, M., Siggia, E., y Lippincott-Schwartz, J. (1997). Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. J. Cell Biol. 139, 1137-1155.

Silva, C., Kommineni, K., Oldenbourg, R., y col. (1999). The first polar body does not predict accurately the location of the metaphase II meiotic spindle in mammalian oocytes. Fertil. Steril., 71, 719-721.

Simerly, C. R., Hecht, N. B., Goldberg, E., y Schatten, G. (1993). Tracing the incorporation of the sperm tail in the mouse zygote and early embryo using an anti-testicular alpha-tubulin antibody. Dev. Biol. 158, 536-548.

Simerly, C. y Schatten, G. (1993). Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. Methods Enzymol. 225, 516-552.

Simerly, C., Wu, G., Zoran, S., Ord, T., Rawlins, R., Jones, J., Navara, C., Gerrity, M., Rinehart, J., Binor, Z., Asch, R., y Schatten, G. (1995). The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans and the implications for infertility. Nature Med. 1, 47—53.

Sousa M., Barros A. y Tesarik J. (1996). The role of rianodine- sensitive Ca^{2+} stores in the Ca^{2+} oscilation machine of human oocytes. Mol. Hum. Reprod., 2: 265-272.

Staessen, C., Janssenswillen, C., Devroey, P. y col. (1993). Cytogenetic y morphological observations of single pronucleated human oocytes after in- vitro fertilization. Hum. Reprod., 8, 221-223.

Stearns, T., y Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: The central role of γ-tubulin. Cell 76, 623-637.

Stricker, S. A., y Schatten, G. (1989). Nuclear envelope disassembly and nuclear lamina depolymerization during germinal vesicle breakdown in starfish. Dev. Biol. 135: 87-98.

Sultan, K.M., Munne, S., Palermo, G.D., Alikani, M., Cohen, J. (1995). Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 1, 132-136.

Sutovsky, P., Hewitson, L., Simerly, C. R., Tengowski, M. W., Navara, C. S., Haavisto, A., y Schatten, G. (1996a). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for Rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal, and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. Hum. Reprod. 11, 1703-1712.

Sutovsky, P., Navara, C. S., y Schatten, G. (1996b). The fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization in vitro. Biol. Reprod. 55, 1195-1205.

Sutovsky, P., y Schatten, G. (1997). Depletion of glutathione during oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. Biol. Reprod. 56, 1503-1512.

Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., y Schatten, G. (1997a). The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. Dev. Biol. 188, 75-84.

Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L. C., Tengowski, M. W., y Schatten, G. (1997b). Involvement of oocyte microvillli and microfilaments in the removal of the sperm's perinuclear theca-A prerequisite for the success of mammalian fertilization. Mol. Biol. Cell 8/Suppl: 106a.

Sutovsky, P., Tengowski, M.W., Navara, C.S., Zoran, S.S., y Schatten G. (1997c). Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not non-mammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. Mol. Reprod. Dev. 47, 79-86.

Sutovsky, P., y Schatten, G. (1998). Structural aspects of mammalian fertilization: New discoveries and inspirations from the work of Daniel Szöllösi. Reprod. Nutr. Dev. 38, 629-641.

Sutovsky, P., Moreno, R., y Schatten, G. (1998a). Sperm mitochondrial ubiquitination and a model explaining the strictly maternal mtDNA inheritance in mammals. Mol. Biol. Cell 9/Suppl., 309a.

Sutovsky, P., Simerly, C, Hewitson, L., y Schatten, G. (1998b). Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes. J. Cell Sci. 111, 2841-2854.

Sutovsky, P., Manandhar, G., y Schatten, G. (1999). Biogenesis of the centrosome during mammalian gametogenesis and fertilization. Protoplasma.

Swann K. (1990). A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. Development, 110: 1295-1302.

Swann, K. (1996). Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilization. Rev. Reprod. 1, 33-39.

Syers, M. A., y Salisbury, J. L. (1989). Centrin-mediated microtubule severing during flagellar excision in Chlamydomonas reinhardtii. J. Cell Biol. 108, 1751—1760.

Szöllösi, D., Calarco, P., y Donahue, R. P. (1972). Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. J. Cell Sci. 11, 521—541.

Szöllösi, D., y Hunter, R. H. F. (1973). Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: Sperm penetration and pronucleus formation. J. Anat. 116, 181—206.

Szöllösi, D. (1976). Oocyte maturation and paternal contribution to the embryo in mammals. Curr. Top. Pathol. 64, 9-27.

Tarkowski, A.K. (1966). An air drying method of chromosome preparation from mouse eggs. Cytogenetics, 5, 394-400.

Terasaki, M., Jaffe, L. A., Hunnicutt, G. R., y Hammer, J. A. 3rd (1996). Structural change of the endoplasmic reticulum during fertilization: evidence for loss of membrane continuity using the green fluorescent protein. Dev. Biol. 179, 320-328.

Tesarik, J. y Kopecny, V. (1989a). Developmental control of the human male pronucleus by ooplasmic factors. Hum. Reprod., 4, 962-968.

Tesarik, J. y Kopecny, V. (1989b). Development of the human male pronucleus: ultrastructure y timing. Gamete Res., 24, 135-149.

Tesarik, J. y Sousa, M. (1994a). Comparison of Ca^{2+} responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 62, 1197-1204.

Tesarik, J. y Testart, J. (1994b). Treatment of sperm injected human oocytes with Ca^{2+} ionophore supports the development of Ca^{2+} oscillations. Biol. Reprod., 51,385-391.

Tesarik, J. (1995). Sex chromosomes abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. Lancet, 346, 1096.

Tesarik J. y Sousa M. (1995a). Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca^{2+} fluxes and oocyte intracytoplasmic dislocation. Fertil. Steril., 64: 770-776.

Tesarik J. y Sousa M. (1996). Mechanism of calcium oscilations in human oocytes: a two-store model. Mol. Hum. Reprod. 2: 383-390.

Toshimori, K., Saxena, D. K., Tanii, I., y Yoshinaga, K. (1998). An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm-oocyte fusion in mice. Biol. Reprod. 59, 22-29.

Urch, U. A., y Patel, H. (1991). The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysulfated polysaccharides. Development. 111, 1165-1172.

Usui, N. (1996). Morphological differences in nuclear materials released from hamster sperm heads at an early stage of incorporation into immature oocytes, mature oocytes, or fertilized eggs. Mol. Reprod. Dev. 44:132-140.

Usui, N., A. Ogura, Y. Kimura, y Yanagimachi, R. (1997). Sperm nuclear envelope: breakdown of intrinsic envelope and de novo formation in hamster oocytes or eggs. Zygote 5, 35-46.

Usui, N., y Yanagimachi, R. (1976). Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization y early development. J. Ultrastruct. Res. 57: 276-288.

Van Blerkom, J., Davis, P., Merriam, J., y col. (1995). Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in humans. Hum. Reprod. Update, 5, 429-461.

Van Steirteghem, A. C., Liu, J., Joris, H. y col. (1993a). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum. Reprod., 8, 1055-1060.

Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H. y col. (1993b). High fertilization rate and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 8, 1061-1066.

Van Wissen, B., Wolf, J.P., Bomsel-Helmreich, O., Frydman, R. y Jouannet, P. (1995). Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype. Hum. Reprod., 10, 642-648.

Vitullo, A.D. y Ozil, J.P. (1992). Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. Dev. Biol., 151, 128-136.

Vorobjev, I. A., y Chentsov, Y. S. (1982). Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. J. Cell Biol. 93, 938-949.

Wassarman, P. M. (1990). Profile of a mammalian sperm receptor. Development 108, 1-17.

Waters, S. .I, y White, J. M. (1997). Biochemical and molecular characterization of bovine fertilin alpha and beta (ADAM 1 y ADAM 2): a candidate sperm-egg binding/fusion complex. Biol. Reprod. 56, 1245-1254.

Westendorf, J. M., Rao, P.N., y Gerace, L. (1994). Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 714-718.

Wilson, E.B. (1925) The Cell in Development and Heredity. Macmillan, New York, USA.

Winston N., Johnson, M., Pickering, S. y col. (1991). Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. Fertil. Steril., 56, 904-912.

Witkowska, A. (1973). Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development. J. Embryol. Exp. Morph., 30, 519-45.

Wolfsberg, T. G., Bazan, J. F., Blobel, C. P., Myles, D. G., Primakoff, P., y White, J. M. (1993). The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci U S A 90, 10783-10787.

Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P., Primakoff, P., Myles, D. G., White, J. M. (1995). ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. Dev. Biol. 169, 378-83.

Woolley, D. M., y Fawcett, D. W. (1973). The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. Anat. Rec. 177, 289-301.

Wramsby, H. y Fredga, K. (1987). Chromosome analysis of human oocytes failing to cleave after insemination in vitro. Hum. Reprod., 2, 137-142.

Wright, S. J., y Longo, F. J. (1988). Sperm nuclear enlargement in fertilized hamster eggs is related to meiotic maturation of the maternal chromatin. J. Exp. Zool. 247, 155-65.

Wu, G.-J., Simerly, C., Zoran, S. S., Funte, L. R., y Schatten, G. (1996). Microtubule and chromatin dynamics during fertilization and early development in rhesus monkeys, and regulation by intracellular calcium ions. Biol. Reprod. 55, 260-270.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In The Physiology of Reproduction (E. Knobil y J.D. Neill, eds.), second edition, pp. 189—317. Raven Press, New York.

Yuan, R., Primakoff, P., Myles, D.G. (1997). A role for the disintegrin domain of candritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. J Cell Biol 137:105-12.

Zamboni, L., y Mastroianni, L. Jr. (1966). Electron microscopic studies of rabbit ova. I. The follicular oocyte. J. Ultrastruct. Res. 14, 95-117.

Zenzes, M.T. y Casper, R.F. (1992). Cytogenetics of human oocytes, zygotes and embryos after in vitro fertilization. Hum. Genet., 88, 367- 375.

Zenzes, M.T., Belkien, L., Bordt, J. y col. (1985). Cytologic investigation of human in vitro fertilization failures. Fertil. Steril., 43, 883-891.

Zenzes, M.T., de Geyter, C., Bordt, J., y col. (1990). Abnormalities of sperm chromosomes condensation in the cytoplasm of immature human oocytes. Hum. Reprod., 5, 842-846.

Zeviani, M., y Antozzi, C. (1997). Mitochondrial disorders. Mol. Hum. Rep. 3, 133-148.

Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., y Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ-tubulin-containing ring complex. Nature 378, 578-583.

Zoran, S., Simerly, C., Schoff, P., Stearns, T., Salisbury, J., y Schatten, G. (1994). Reconstitution of the human sperm centrosome in vitro. Mol. Biol. Cell 5/Suppl., 38a.

Zuelke, K. A., Jones, D. P., y Perreault, S. D. (1997). Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. Biol. Reprod. 57, 1413-1419.