



Sociedad
Argentina de
Andrología

AFILIADA A LA INTERNATIONAL
SOCIETY OF ANDROLOGY

Director

Pablo Knoblovits

Comité Editorial

Berta Denduchis

Lucrecia Piñeiro

Rodolfo Rey

Marcelo Rodríguez

Claudio Terradas

Coordinadora Comercial

Nora Klass

CONSEJO EDITORIAL

José Luis Arrondo (España)

Ana María Blanco (Argentina)

Jorge Blaquier (Argentina)

Mario Burgos (Argentina)

Eduardo Bustos Obregón (Chile)

Juan Calamera (Argentina)

Ricardo Calandra (Argentina)

Héctor Chemes (Argentina)

Abraham L. Kierszenbaum (EE.UU.)

Livia Lustig (Argentina)

Alicia Mazzolli (Argentina)

Anselmo Palacios (Venezuela)

Alberto Solari (Argentina)

Mónica Vazquez-Levin (Argentina)

**COMISIÓN DIRECTIVA
DE LA SOCIEDAD ARGENTINA
DE ANDROLOGÍA**

Presidente: *Livia Lustig*

Vicepresidente: *Santiago Brugo Olmedo*

Secretario: *Alberto Nagelberg*

Prosecretario: *José Miguel Sciorra*

Tesorero: *Néstor Pacenza*

Protesorero: *Jorge Adrián Villemur*

Vocales: *Selva Cigorraga*

y Rodolfo Rey

Vocales Suplentes: *Patricia Cuasnicú*

y Silvia Gottlieb

Revisor de cuentas

titular: *Berta Denduchis*

suplente: *Marcelo Gabriel Rodríguez*

SUMARIO

Informe de Secretaría 2

Trabajo original

Prostaglandinas: su participación en la regulación de la función testicular y la (in)fertilidad masculina.

Mónica B Frungieri, Silvia I Gonzalez-Calvar,
María Eugenia Matzkin, Artur Mayerhofer,
Ricardo S Calandra

3

Actualización

Mecanismos Moleculares del Proceso de Fecundación.
Parte II. La interacción espermatozoide-ovocito.

Mónica Hebe Vazquez-Levin y Clara Isabel Marin-Briggiler 8

Trabajo original

Efecto de los nuevos antidepresivos sobre la función sexual del varón.

Luis Finger 17

Reunión Anual 2007 21

Congresos y Cursos Nacionales e Internacionales 22

2007 Sociedad Argentina de Andrología

ISSN 1669-7618

La Revista Argentina de Andrología es continuación del Boletín Informativo de la SAA.

Reg. Propiedad Intelectual: 531653

Propietario: Sociedad Argentina de Andrología

Redacción y Administración:

**Revista Argentina de Andrología
de la Sociedad Argentina de Andrología**

C.C. 137 Suc. 53 (B) - C1453ZAA Ciudad de Buenos Aires

Vuelta de Obligado 2490 - 1428 Ciudad de Buenos Aires

e-mail: saa@saa.org.ar - página web: <http://www.saa.org.ar>

Reservados todos los derechos. No puede reproducirse, almacenarse en un sistema de recuperación o transmitirse en forma alguna por medio de cualquier procedimiento, sea éste mecánico, electrónico, de fotocopia, grabación o cualquier otro, sin el previo permiso escrito del editor.

La revista no se hace responsable de las opiniones emitidas por los autores.

Diseño, Composición e Impresión:

Gráfica Latina S.A. Av. de los Constituyentes 3423 - Ciudad de Bs. As.

Tel.: (54-11) 4522-7888 - info@graficalatina.com.ar - www.graficalatina.com.ar

Indizado en LILACS

ACTUALIZACIÓN

Mecanismos Moleculares del Proceso de Fecundación. Parte II. La interacción espermatozoide-ovocito.

Mónica Hebe Vazquez-Levin y Clara Isabel Marin-Briggiler

Laboratorio de Estudios Moleculares del proceso de Interacción de Gametas.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: mbvaz@dna.uba.ar

Introducción

El proceso de fecundación involucra una secuencia altamente coordinada de interacciones entre el espermatozoide y el ovocito para dar origen a una cigota viable. El presente artículo y otro publicado en el número 1 de la Revista Argentina de Andrología del año 2007 han tenido por objetivo presentar una breve actualización del estado de conocimiento de los eventos moleculares involucrados en la fecundación humana y los componentes participantes de este proceso. Este trabajo se referirá a los mecanismos involucrados en la interacción del espermatozoide con el ovocito. Los materiales citados corresponden a una selección de artículos de revisión en la temática presentada, a los que se suman algunas publicaciones recientes sobre avances en reproducción humana y sólo se mencionan trabajos en animales cuando es estrictamente necesario. Como información complementaria, se sugiere la lectura de trabajos de revisión publicados por profesionales internacionalmente reconocidos en el área [1],[2],[3],[4],[5].

La interacción ovocito-espermatozoide

La interacción entre el ovocito y el espermatozoide es un proceso especializado que lleva a la fecundación y a la activación del desarrollo embrionario. El mecanismo propuesto, resultado de estudios realizados en varias especies de mamíferos [1-5] establece que los espermatozoides que han completado la capacitación inicialmente se unen a la *zona pellucida* (ZP) y sufren la exocitosis acrosomal (EA). Los espermatozoides reaccionados penetran la ZP, alcanzan el espacio perivitelino y se unen y fusionan a la membrana plasmática del ovocito (oolema), permitiendo así el ingreso de la cabeza espermática al citoplasma ovocitario (ooplasma) y la decondensación del núcleo espermático (ver esquema en la Figura). La entrada del espermatozoide gatilla mecanismos de bloqueo de la polizoospermia. Estudios más recientes sugieren modificaciones a este mecanismo clásico [6,7], que se mencionarán oportunamente.

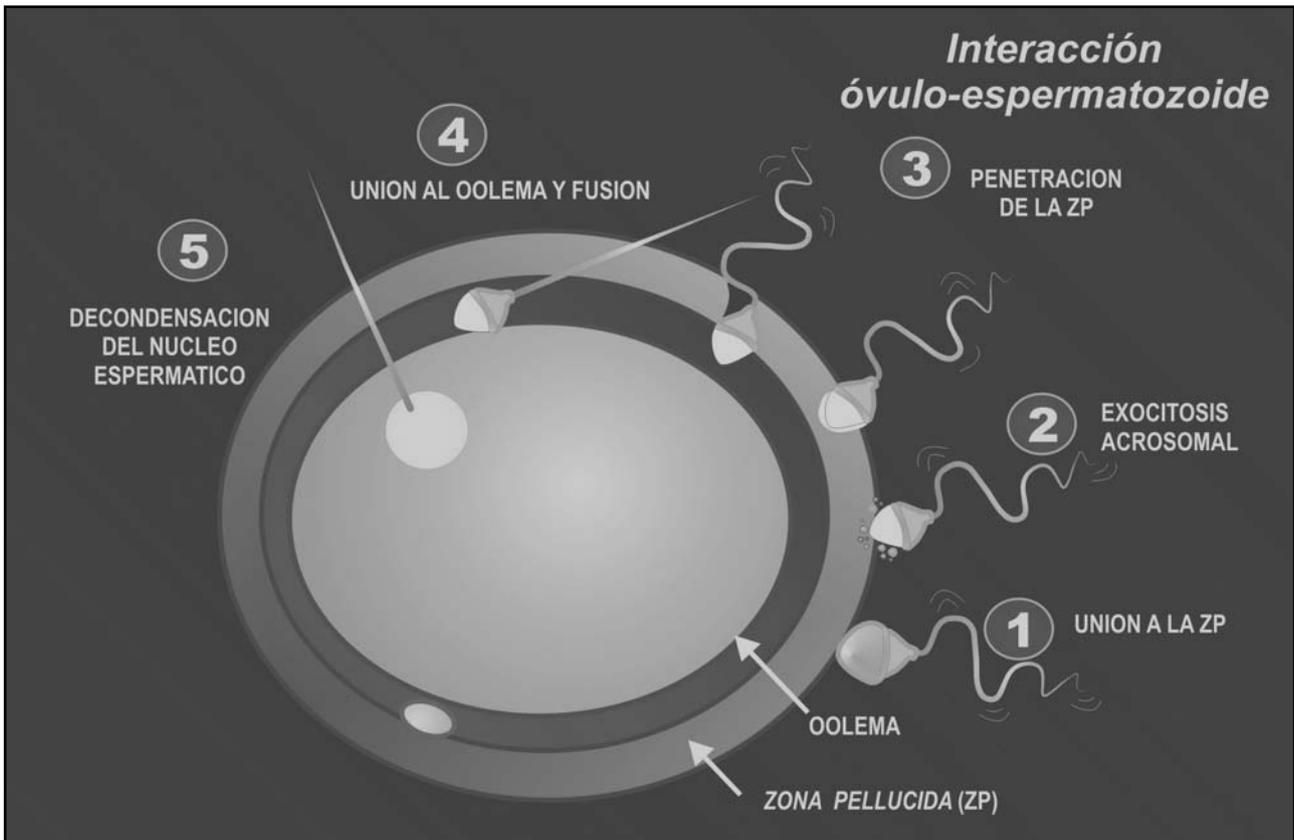
En los próximos párrafos se presentará una descripción general de las bases moleculares de la interacción espermatozoide-ZP y espermatozoide-oolema; asimismo, se hará mención a la composición de la ZP, a las proteínas espermáticas propuestas para el reconocimiento e interacción con la ZP y el oolema, y a algunos aspectos moleculares del proceso de EA.

1. Unión del espermatozoide a la ZP

El mecanismo clásico de la fecundación propone que la unión del espermatozoide a la ZP es un paso relevante en la interacción de las gametas, dado que otorga especificidad de especie a la interacción y gatilla la EA, permitiendo esta última la penetración espermática de la ZP y la fusión con el oolema. Como resultado de numerosas investigaciones, existe un consenso que sugiere que la unión espermatozoide-ZP involucra la interacción de componentes de la ZP con proteínas de la superficie del espermatozoide capacitado, conociéndose a este proceso como unión primaria. Asimismo, la unión de las gametas involucraría la interacción de las proteínas de la ZP con componentes intraacrosomales expuestos cuando los espermatozoides sufren la EA; esta interacción, conocida como unión secundaria, asistiría al espermatozoide a permanecer asociado a la ZP. Numerosas evidencias apoyan la hipótesis que propone que varios componentes de la ZP y del espermatozoide participarían en los eventos de unión entre las gametas, así como en la activación de diversas cascadas de señalización y de canales iónicos (ver Exocitosis Acrosomal).

La Zona Pellucida

La ZP es una matriz glicoproteica acelular que rodea a todos los ovocitos de mamíferos, y se encuentra ubicada entre la capa más interna de las células foliculares y el oolema. Es la última barrera que el espermatozoide debe atravesar para lograr la fecundación; asimismo, protege al ovocito del daño físico al que pueda estar expuesto, otorga especificidad de especie a la interacción de gametas, y contri-



Representación esquemática de los principales eventos que tienen lugar durante la interacción de gametas. Los espermatozoides que han completado la capacitación inicialmente se unen a la *zona pellucida* (ZP) (1) y sufren la exocitosis acrosomal (2); los espermatozoides reaccionados penetran la ZP (3), alcanzan el espacio perivitelino, se unen a y se fusionan con la membrana plasmática del ovocito (oolema) (4), permitiendo así el ingreso de la cabeza espermática al citoplasma ovocitario (ooplasma) y la decondensación del núcleo espermático (5).

buye al bloqueo de la polizoospermia luego de la fusión. Finalmente, la ZP provee un entorno definido al embrión preimplantatorio y lo protege de todo tipo de injuria.

La dilucidación de los aspectos moleculares relativos a la composición, estructura y funciones de la ZP ha resultado de las investigaciones realizadas en el modelo de ratón. Los estudios bioquímicos revelaron que la ZP está compuesta principalmente por tres glicoproteínas, llamadas ZP1m, ZP2m, y ZP3m, ensambladas en una red de filamentos. Estudios posteriores caracterizaron estos componentes a nivel molecular, y se han desarrollado modelos experimentales combinando mutagénesis dirigida y transgénesis para estudiar sus funciones. Las investigaciones realizadas permitieron proponer que ZP3m es el ligando de la unión primaria y que gatilla/acelera la EA (ver más adelante); ZP2m estaría involucrada en la unión secundaria a la ZP y ZP1m mantendría la integridad de la estructura de la ZP. Estudios con modelos de genética molecular han desafiado el mecanismo clásico, y proponen que

ZP2m regularía una estructura supramolecular requerida para sostener el evento de unión a la matriz [6]. Basado en ese mismo modelo de estudio, se ha propuesto recientemente un mecanismo alternativo de interacción que involucraría la liberación de quimioattractantes ovocitarios, que guiarían al espermatozoide durante la interacción [7]; sin embargo, hasta el presente, no se han identificado las moléculas responsables de ese mecanismo de guía.

En la ZP humana inicialmente se identificaron tres glicoproteínas [8], denominadas ZPAh¹, ZPBh, ZPCh², determinándose su estructura primaria a partir de la caracterización del ADNc [9]. Posteriormente, se identificó un transcripto adicional (ZP1h), y se describió la presencia de la proteína ZP1h [10]. El análisis de secuencia reveló que ZPAh es el homólogo de ZP2m, ZPCh el de ZP3m, y ZP1h es el ortólogo de ZP1m y el parálogo de ZPBh.

La ZP humana tendría un rol selectivo para los espermatozoides morfológica y funcionalmente normales; así, se ha observado que los espermatozoides unidos a la ZP presentan morfología [11], y cromati-

na normal [12]. Conjuntamente, se ha encontrado una correlación positiva entre el número de espermatozoides unidos a la ZP y las proteínas espermáticas fosforiladas en residuos tirosina [13].

Las glicoproteínas de la ZP humana participarían en la unión primaria y secundaria. Numerosas evidencias muestran que estos eventos involucran residuos fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y manosa, así como azúcares sulfatados de la ZP. Sin embargo, la participación de la cadena polipeptídica de las proteínas de la ZP en la interacción no debe ser descartada.

Los estudios bioquímicos y funcionales con las proteínas de la ZP humanas aisladas no han sido posibles, debido a la limitación en el material biológico disponible. A fin de sobrellevar esta dificultad, varios grupos de investigación han desarrollado sistemas *in vitro* para producir las proteínas de la ZP en células procariotas y eucariotas por tecnología de ADN recombinante, y evaluar sus funciones [14],[15],[16],[17],[18],[19],[20],[21]. Se ha observado que la proteína recombinante ZPCh se asocia a la cabeza del espermatozoide e interfiere con la interacción espermatozoide-ZP [18],[22],[23]. Con respecto a ZPAh, un fragmento de la proteína producido en bacterias se une a espermatozoides reaccionados, y anticuerpos específicos bloquean la unión y penetración espermática de la ZP homóloga [24]. Asimismo, nuestro grupo caracterizó la interacción entre ZPAh recombinante y el sistema proacrosina/acrosina [25], la que en parte sería mediada por azúcares de la proteína de la ZP [26] (ver más adelante). Además de la actividad de unión a componentes espermáticos, las proteínas recombinantes de la ZP mostraron capacidad de inducir la EA (ver más adelante) y fueron utilizadas como antígenos en modelos de anticoncepción inmunológica. El uso de proteínas recombinantes de la ZP humana con actividad biológica permitirá entender las bases moleculares de la interacción entre el espermatozoide y la matriz, así como desarrollar métodos alternativos para el diagnóstico de la infertilidad.

Receptores espermáticos involucrados en la interacción con la ZP

La literatura en este tema es vasta, y se han publicado evidencias sobre la participación de numerosas proteínas en la interacción con la ZP. Los estudios han empleado modelos experimentales en roedores, así como en otros mamíferos; asimismo, se han utilizado numerosas metodologías, desde estudios de biología celular y bioquímica, hasta biología molecular y genética experimental, incluyendo los modelos de "knock out" o remoción específica

de genes por recombinación homóloga. Las proteínas propuestas incluyen una variedad de enzimas (β -1,4-galactosiltransferasa/GalTasa; α -fucosiltransferasa; α -manosidasas; N-acetilglucosaminidasa/Hex; fosfolipasa A2), y proteínas ligadoras de azúcares (receptores de manosa, galactosa y fucosa; p47/SED1 y otras adhesinas espermáticas; zonaadhesinas; proteínas tipo selectinas), así como otras proteínas (FA-1; P34H y homólogos P26h/P25b; SLIP-1, una "Sulpho Lipid Immobilizing Protein" 1; p66; cadherina epitelial; CRISP-1). En el modelo humano, se ha descrito la presencia de algunas de estas proteínas: FA-1 y P34H, GalTasa, Hex, selectina, SLIP-1, p66, y cadherina epitelial. Además de estas proteínas de superficie, otras proteínas acrosomales participarían en la interacción con proteínas de la ZP, estando posiblemente involucradas en la unión secundaria. Entre ellas, se encuentran proacrosina/acrosina, PH20, sp56, acrina2/MC41, sp38/IAM38, y Sp17; en el modelo humano existen trabajos que demuestran la expresión de proacrosina/acrosina (ver más adelante), PH20, Sp17, y SOB3. A continuación se presenta una breve descripción de FA-1, P34H y proacrosina/acrosina; la selección de estas proteínas se ha basado tanto en la extensa literatura sobre las mismas como en los estudios que las relacionan con la fertilidad en el hombre.

FA-1 es una glicoproteína de 51 KDa presente en la región postacrosomal, pieza media y cola del espermatozoide humano que fue inicialmente descrita en el ratón y cuya secuencia codificante humana ha sido caracterizada [27]. Su participación en la interacción de las gametas humanas ha sido sugerida por estudios que describen la capacidad de anticuerpos específicos y de la proteína purificada de bloquear la unión espermatozoide-ZP [28]. Asimismo, se detectaron anticuerpos contra FA-1 en el suero de hombres y mujeres subfértiles; la presencia de los mismos podría afectar la fecundación, como se demostrara en animales, en los que la inmunización con la proteína o su ADN codificante tuvo un efecto anticonceptivo [29].

P34H es una proteína de 34 KDa, de origen epididimario, localizada en el capuchón acrosomal de espermatozoides eyaculados y capacitados. La participación de P34H en la fecundación humana fue evidenciada a través de la capacidad de anticuerpos específicos de bloquear la unión a la ZP [30]. Investigaciones posteriores revelaron la presencia de concentraciones significativamente menores de P34H en pacientes con infertilidad sin causa aparente [31]. Finalmente, un estudio reciente demostró una correlación positiva entre la proporción de

casos con P34H y el éxito en fecundación in vitro (FIV) [32]. Todos estos resultados han llevado a proponer a P34H como un marcador de fertilidad en la evaluación del hombre subfétil.

La acrosina es una proteasa espermática acrosomal que ha sido estudiada en numerosas especies. Además de su actividad proteolítica (ver más adelante), estudios bioquímicos han revelado que la acrosina humana y su zimógeno proacrosina, se unen a componentes de la ZP nativa y a las proteínas recombinantes de la misma [25][33]. Resultados de nuestros trabajos demostraron que la proacrosina tiene mayor capacidad de unión a las proteínas de la ZP, principalmente ZPAh; dicha interacción involucraría azúcares de la ZPAh [25][26], y puede ser bloqueada por anticuerpos antiacrosina presentes en el suero de pacientes subfétiles [Veute, Vazquez-Levin et al, en consideración]. Nuestro grupo ha propuesto un modelo que combina la capacidad de unión del sistema proacrosina/acrosina humana a las proteínas de la ZP con las propiedades líticas de la enzima madura acrosina en el proceso de interacción espermatozoide-ZP (ver más adelante).

2. La Exocitosis Acrosomal (EA)

Luego de la unión a la ZP, los espermatozoides capacitados pueden sufrir la EA. El acrosoma es una organela tipo lisosoma, que cubre la porción anterior del núcleo espermático. La membrana que yace sobre el núcleo ha sido llamada membrana acrosomal interna, y la porción que se ubica debajo de la membrana plasmática se denomina membrana acrosomal externa. El acrosoma contiene un compartimiento soluble y uno particulado (este último conocido como matriz acrosomal), constituido por varias proteínas con propiedades hidrolíticas [34].

La EA es un proceso irreversible que involucra una serie compleja de eventos intracelulares, que resultan en la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que la recubre, con la consiguiente liberación del contenido acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna. La ocurrencia de la EA facilita la penetración espermática a través de la ZP, y la exposición de ciertas moléculas del segmento ecuatorial, que participarían en la fusión con el oolema (ver más adelante) [3].

Los estudios realizados en varias especies han demostrado que la mayoría de los espermatozoides que llegan al oviducto tienen su acrosoma intacto; algunas células iniciarían la EA mientras atraviesan el *cumulus oophorus*, pero el espermatozoide fecundante completaría la EA durante la interacción con las glicoproteínas de la ZP [1][2][3][4], si bien un estudio reciente propone que la unión espermática

a la ZP no sería suficiente para inducir la EA [7].

En el modelo murino, el mecanismo clásico propone que la unión de ZP3m a receptores espermáticos específicos causaría su agregación y activación [35]; los receptores activados desencadenarían una cascada de eventos que culminarían con la fusión de las membranas y la liberación de los componentes acrosomales. Brevemente, la EA inducida por ZP3m involucraría la activación de proteínas G, alcalinización intracelular, depolarización de la membrana plasmática, aumento transiente de las concentraciones de iones calcio (Ca^{2+}) intracelular por activación de canales dependientes de voltaje del tipo T, generación de inositol-3,4,5-trifosfato (IP3), incremento sostenido de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} por vaciamiento de reservorios de Ca^{2+} sensibles a IP3 y apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, y producción de compuestos fusogénicos. En el modelo alternativo propuesto recientemente, la unión a la ZP o el tamaño de poro pequeño de los intersticios de la matriz produciría un enlentecimiento del espermatozoide, y la fuerza propulsora del flagelo transportaría una señal mecano-sensorial que conduciría a la movilización de Ca^{2+} de reservorios intracelulares y a la inducción de la EA [7].

Se ha descrito que la ZP humana nativa o solubilizada induce la pérdida del acrosoma en espermatozoides humanos capacitados [36]; sin embargo, debido a restricciones en la disponibilidad del material biológico, la identidad de los componentes de la ZP responsables de desencadenar la EA no ha sido determinada. Estudios usando proteínas recombinantes humanas han mostrado que ZPCh recombinante producida en células eucariotas es capaz de provocar la EA, involucrando la activación de receptores de glicina y receptores nicotínicos de acetilcolina, y la participación de proteína G_i , con influjo de Ca^{2+} . Además, hallazgos recientes indican que ZPBh producida en células de insecto induce la EA en espermatozoides capacitados por activación de un receptor independiente de G_i [20],[21].

Los mecanismos moleculares que controlan la fusión de membranas durante la EA han sido extensamente estudiados en los últimos años. Se ha caracterizado la participación de las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptors*) y otras proteínas asociadas [37][38], que regulan la fusión de membranas durante la exocitosis de células somáticas. Además, se ha descrito que la EA de espermatozoides humanos requiere la actividad de tirosina kinasas y fosfatasa, indicando que la fosforilación proteica en tirosina está involucrada en este proceso [39].

En los espermatozoides humanos capacitados, la EA también puede ser inducida por exposición a secreciones del *cumulus oophorus* y fluidos oviductal y folicular. Se ha demostrado que la actividad inductora de la EA del fluido folicular humano (FFh) reside en su contenido de progesterona, y nuestros estudios indican que anticuerpos presentes en el FFh de pacientes infértiles también son capaces de provocar la pérdida del acrosoma [40]. Aunque la relevancia de estos factores en la EA fisiológica todavía es desconocida, es posible que diferentes agonistas presentes en la vecindad del ovocito, desencadenen mecanismos aditivos o sinérgicos que lleven a maximizar la respuesta exocitótica. La progesterona y el fluido folicular han mostrado un efecto de "priming" sobre la EA inducida por ZP en espermatozoides de ratón y humanos [41]. La exposición de espermatozoides humanos a un gradiente de progesterona, que simula las condiciones del sitio de fecundación, conduce a un incremento bajo y a oscilaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} ; dicho estímulo resulta insuficiente para provocar la EA, pero estimula el movimiento espermático [42].

Dado que sólo los espermatozoides capacitados pueden sufrir la EA en respuesta a estímulos fisiológicos, la ocurrencia de la EA indica que se ha completado el proceso de capacitación. Ambos fenómenos están íntimamente relacionados, e intentar disociar los mecanismos moleculares que gobiernan cada uno de ellos es difícil. Los resultados de nuestros estudios han revelado que mientras que 0,22 mM de Ca^{2+} en el medio de incubación es suficiente para permitir la ocurrencia de varios eventos relacionados con la capacitación, una concentración 0,58 mM de este catión es requerida para inducir la EA en respuesta a FFh [43]. La capacitación espermática puede ser llevada a cabo en un medio en el que los Ca^{2+} sean reemplazados por Sr^{2+} , pero este ión no permite la EA inducida por FFh [44]. La incubación de los espermatozoides bajo condiciones iónicas específicas permitiría la separación temporal de la capacitación y la EA, y la implementación de estos modelos llevará a mejorar el conocimiento de las bases moleculares de estos procesos.

Para obtener mayor información sobre la EA, los autores sugieren la lectura de los siguientes trabajos de revisión de publicación reciente: [45],[46].

3. Penetración espermática de la ZP

Los espermatozoides que completaron la EA son capaces de penetrar la ZP y fusionarse con el oolema. El tiempo que los espermatozoides necesitan para completar la penetración espermática es variable (ej. ratón 15-26 min), y principalmente depende

del estado de capacitación del espermatozoide en el momento de la inseminación. Durante la penetración, los espermatozoides mueven el flagelo de manera vigorosa, y en muchos casos realizan trayectorias curvas, dejando una huella a su paso [1].

Los mecanismos por los cuales los espermatozoides penetran la ZP todavía no han sido dilucidados totalmente. Se han propuesto varias hipótesis, entre ellas la "mecánica" y la "enzimática". En la primera, el espermatozoide penetraría la ZP usando la fuerza provista por la motilidad e independientemente de la actividad enzimática; en la segunda, el espermatozoide necesitaría la actividad lítica de enzimas acrosomales para la penetración, y la motilidad no sería relevante. Una tercera hipótesis combina ambas propiedades, la motilidad vigorosa flagelar y la actividad lítica espermática [1],[5].

La participación de proteasas espermáticas de tipo tripsina en la penetración de la ZP fue sugerida en los estudios que mostraban el efecto bloqueante de inhibidores de tripsina sobre este proceso [47]. De los componentes acrosomales estudiados, el sistema proacrosina/acrosina ha sido el más caracterizado [48]. Tal como ya se explicara, la acrosina (EC 3.4.21.10) es una endoproteasa tipo tripsina sintetizada y almacenada en el acrosoma en la forma de zimógeno, proacrosina. La enzima madura activa, la acrosina, es liberada durante la EA, y existen evidencias que sugieren que su activación es acelerada por componentes de la ZP. El concepto clásico que postula que la penetración de la ZP es asistida por la proteólisis mediada por acrosina se encuentra en revisión, dado que ratones "knock out" para el gen de acrosina son fértiles; sin embargo, esos animales presentan una fecundación retardada, sus espermatozoides no fertilizan ovocitos si se mezclan con espermatozoides de la cepa salvaje en el ensayo de fecundación, y tienen un desempeño deficiente cuando se enfrentan a ovocitos con ZP "endurecidas" luego de un tratamiento químico [49]. Estas evidencias sugieren una desventaja para los espermatozoides de animales deficientes del gen de acrosina en su capacidad de penetrar la ZP. Si bien se han identificado otras proteasas en el ratón "knock out" que podrían actuar en reemplazo de acrosina, aún no se han identificado los homólogos humanos. Estudios posteriores con esos animales indicaron que la actividad enzimática de acrosina participaría durante la EA en la liberación de los contenidos acrosomales.

En humanos, se ha asociado la presencia de una actividad enzimática de acrosina baja con la infertilidad. Un estudio de nuestro grupo identificó una actividad disminuida de acrosina en pacientes con in-

fertilidad sin causa aparente, observándose que la actividad baja estaba asociada a una tasa de fecundación anormal en FIV, y a cambios en el patrón de activación de la proenzima [50].

Los resultados presentados sugieren que los mecanismos que controlan la penetración de la ZP todavía no han sido establecidos; estudios futuros permitirán determinar las bases moleculares de este evento.

4. La fusión del espermatozoide al oolema

Los espermatozoides que han completado la EA y la penetración de la ZP alcanzan el espacio perivitelino, se unen a y se fusionan con el oolema. La interacción entre el espermatozoide fecundante y el oolema involucraría el contacto y la unión entre receptores localizados en la membrana acrosomal interna de la región apical de la cabeza y las microvellosidades de la membrana ovocitaria. Esta interacción es disociada por efecto de proteasas, luego de lo cual el espermatozoide se ubica paralelo y une al oolema y finalmente se fusionaría por el segmento ecuatorial. Aparentemente, la región anterior del espermatozoide es incorporada al ovocito por fagocitosis, y la región postacrosomal y flagelo son incorporados vía fusión de membranas. Una indicación visible de la fusión es la reducción en el movimiento de la cola espermática, que ocurre pocos segundos después de haberse completado el evento de fusión. En condiciones fisiológicas, solo un espermatozoide se fusiona con el oolema [1],[51],[52].

Los espermatozoides intactos (que no han sufrido EA) no son capaces de fusionarse al ovocito independientemente de su estado de capacitación; como resultado o concomitante con la EA, la membrana plasmática en el segmento ecuatorial sufre cambios fisiológicos que le confieren la capacidad de fusionarse con el ovocito; de esta manera la EA es un requisito absoluto para la fusión de las gametas. Contrastando, no se requiere una motilidad espermática fuerte para una fusión exitosa [1].

Muchas proteínas espermáticas han sido propuestas como candidatos para la fusión entre las gametas. Numerosos estudios han propuesto a miembros de la familia de proteínas MDC (Metaloproteinase-like Domain, Desintegrin-like domain, Cystein-rich domain) o ADAM (A Desintegrin And Metalloproteinase), en particular fertilina-, (ADAM2) y cirtestina (ADAM3). Sin embargo, estudios de delección génica revelaron que el proceso de fusión ocurre en ausencia de estas proteínas. En el modelo humano, los genes que codifican para fertilina- β (ADAM1), tMCDII y cirtestinas no son funcionales, pero los espermatozoides expresan otros

miembros de la familia (ADAM18), que podrían participar en la unión al oolema [53].

Estudios recientes han identificado una proteína de transmembrana novel, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas tipo I llamada IZUMO. Esta proteína se expone luego de la EA, y sería esencial para la fusión espermatozoide-ovocito en el ratón, dado que los animales macho carentes del gen (IZUMO -/-) son estériles y los espermatozoides de esos animales son incapaces de fecundar *in vitro*. En el hombre, se determinó que un anticuerpo específico anti IZUMO inhibe la penetración espermática de ovocitos de hámster desprovistos de ZP, sin afectar otros eventos de la fecundación [54]. Sin embargo, la expresión de IZUMO en pacientes con oligozoospermia severa y/o astenozoospermia, y en pacientes con falla de FIV fue aparentemente normal [55].

Otras proteínas podrían participar en este evento de la fecundación; la capacidad de anticuerpos específicos de bloquear la penetración de ovocitos de hámster sugiere la participación de FLB1, SOB2 (Sperm Oocyte Binding 2 protein), gp20, SP-10, ARP, SAMP32, SAMP14, TPX1, así como cadherinas epitelial y neuronal.

Con respecto a las proteínas del ovocito que participarían en la fusión, inicialmente se consideró que las integrinas serían la contraparte de las proteínas ADAM, pero se ha determinado que no son necesarias en humanos. Sin embargo, su participación no ha sido descartada totalmente, especialmente considerando la presencia de agrupamientos o "clusters" de la integrina α -6- β -1 en el sitio del contacto con el espermatozoide [56]. Además de estas proteínas, estudios realizados en el modelo murino demostraron que CD9 tiene un rol crítico en la fusión de las gametas; ratones hembra deficientes en CD9 (CD9 -/-) presentaron una reducción severa de la fertilidad, y esa deficiencia se corrigió con la microinyección de los espermatozoides en el citoplasma ovocitario. En el modelo humano, anticuerpos específicos contra CD9 inhiben el "clustering" de otras proteínas que estarían directamente involucradas en la fusión [56].

Los mecanismos de fusión que involucran virus encapsulados y células huésped y los de vesículas citoplásmicas de transporte y membranas blanco han sido extensamente estudiados [52]. Hasta el momento, las evidencias son insuficientes para determinar si el mecanismo de fusión de las gametas humanas se asemeja a alguno de ellos o constituye uno aún no descrito.

Una vez que el espermatozoide fecundante ha entrado en el ooplasma, se gatilla el bloqueo de la polizoospermia por cambios en el oolema y en las

proteínas de la ZP que llevan a su endurecimiento. Finalmente, se activa la formación de la cigota y su desarrollo, a través de una cadena de reacciones de señalización intracelular y con la provisión de componentes espermáticos [1].

Conclusiones

Los artículos I y II han reseñado, desde el espermatozoide, los mecanismos moleculares involucrados en la fecundación humana. Los estudios revelan la extrema complejidad del proceso, indicando que muchos de los eventos que lo componen están regulados por la interacción de ambas gametas, de las gametas con otras células, con estructuras acelulares o con secreciones presentes en los tractos reproductores femenino y masculino.

La literatura ha acumulado evidencias mayoritariamente de estudios *in vitro*, por lo que debe tenerse en cuenta que las conclusiones son restringidas por los diseños experimentales utilizados. Debe entenderse que resulta prácticamente imposible reproducir este escenario complejo *in vitro*, lo cual representa una gran limitación técnica para el entendimiento del proceso de la fecundación. Sin embargo, más allá de estas deficiencias, los estudios *in vitro* han permitido el desarrollo de métodos de diagnóstico y protocolos terapéuticos, siendo el procedimiento de FIV el mejor ejemplo.

Se ha determinado que las funciones de las células somáticas son moduladas por varios de los mecanismos moleculares de los procesos de capacita-

ción, EA y fusión con el ovocito. Asimismo, mucho de lo que actualmente conocemos sobre el proceso de la fecundación fue inicialmente descrito en modelos animales. Sin embargo, se han identificado diferencias en los componentes y mecanismos que regulan las gametas animales y humanas, sugiriendo que muchas de las respuestas a nuestras preguntas sobre la fecundación solo serán encontradas en las células humanas.

Finalmente, en los años recientes, se han hecho grandes esfuerzos para producir animales genéticamente modificados para estudiar el rol de ciertas proteínas en la fecundación. Muchos de estos animales permanecen fértiles, probablemente como consecuencia de la presencia de mecanismos redundantes que aseguran el éxito de un proceso crucial para el mantenimiento de la especie. Si bien estos modelos experimentales son muy interesantes y elegantes, están muy lejanos de la realidad. Creemos que trabajando estrechamente, investigadores y médicos podrán capturar información invaluable a partir de la evaluación exhaustiva del hombre subfértil.

Agradecimientos

La preparación de este manuscrito se llevó a cabo con el apoyo de los subsidios otorgados por la Organización Mundial de la Salud (LID # 97175) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (#PICT2004 05-26110). Agradecemos la colaboración de Ezequiel M. Lentz en la elaboración de la Figura.

Referencias

- [1] **Yanagimachi, R.** Mammalian fertilization. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (ed.), Raven Press Ltd, New York (USA) pp. 189-317, 1994.
- [2] **Wassarman PM, Jovine L, Qi H, Williams Z, Darie C, Litscher ES.** Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol Cell Endocrinol* 234:95-103, 2005.
- [3] **Flesch FM, Gadella BM.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197-235, 2000.
- [4] **Primakoff P, Myles DG.** Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296:2183-2185, 2002.
- [5] **Bedford JM.** Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:429-460, 2004.
- [6] **Dean J.** Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays* 26:29-38, 2004.
- [7] **Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J.** Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosomal exocytosis. *Development* 134:933-943, 2007.
- [8] **Shabanowitz RB, O'Rand MG.** Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil* 82:151-161, 1998.
- [9] **Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG.** Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNA from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and the ZPC gene families. *DNA Seq* 4:361-393, 1994.
- [10] **Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CLR.** Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 19:1580-1586, 2004.
- [11] **Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD.** Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 30:346-352, 1991.
- [12] **Liu DY, Baker HW.** Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed

- by acridine orange fluorescence. *Hum Reprod* 22:1597-1602, 2007.
- [13] **Liu DY, Clarke GN, Baker HW.** Tyrosine phosphorylation on capacitated human sperm tail detected by immunofluorescence correlates strongly with sperm-zona pellucida (ZP) binding but not with the ZP-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 21:1002-1008, 2006.
- [14] **van Duin, M., Polman, J. E., De Breet, I. T., van Ginneken, K., Bunschoten, H., Grootenhuis, A., Brindle, J., Aitken, R. J.:** Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 51:607-617, 1994.
- [15] **Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD.** Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2:583-589, 1996.
- [16] **Chapman NR, Kessopoulou E, Andrews P, Hornby D, Barratt CLR.** The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro. *Biochem J* 330:839-845, 1998.
- [17] **Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, Liu HF.** Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr Purif* 16:298-307, 1999.
- [18] **Dong KW, Chi TF, Juan YW, Chen CW, Lin Z, Xiang XQ, Mahony M, Gibbons WE, Oehninger S.** Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol* 184:835-843; discussion 843-844, 2001.
- [19] **Martic M, Moses EK, Adams TE, Liu DY, Gook DA, Garrett C, Dunlop ME, Baker GH.** Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line. *Asian J Androl* 6:3-13, 2004.
- [20] **Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK.** Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod* 11:365-372, 2005.
- [21] **Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, Gonzalez-Gonzalez ME, Galicia-Chavarria M, Larrea F, Gerton GL.** Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod* 74:760-768, 2006.
- [22] **Whitmarsh AJ, Woolnough MJ, Moore HDM, Hornby DP, Barratt CLR.** Biological activity of recombinant human ZP3 produced in vitro: potential for a sperm function test. *Mol Hum Reprod* 2:911-919, 1996.
- [23] **Marín-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverría MF, Harris JD, Vazquez-Levin MH.** Recombinant human zona pellucida protein C produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells binds to human spermatozoa and inhibits sperm-zona pellucida interaction. *Fertil Steril*, 2007 (en prensa).
- [24] **Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K:** Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* 61:1649-1654, 1999.
- [25] **Furlong LI, Harris JD, Vazquez-Levin MH.** Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. I. Studies with recombinant ZPA, ZPB, and ZPC. *Fertil Steril* 83:1780-1790, 2005.
- [26] **Furlong LI, Veaute C, Vazquez-Levin MH.** Binding of recombinant human proacrosin/acrosin to zona pellucida (ZP) glycoproteins. II. Participation of mannose residues in the interaction. *Fertil Steril* 83:1791-1796, 2005.
- [27] **Naz RK, Zhu X.** Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding for human FA-1 antigen. *Mol Reprod Dev* 63:256-268, 2002.
- [28] **Kadam AL, Fateh M, Naz RK.** Fertilization antigen (FA-1) completely blocks human sperm binding to human zona pellucida: FA-1 antigen may be a sperm receptor for zona pellucida in humans. *J Reprod Immunol* 29:19-30, 1995.
- [29] **Naz RK.** Effect of fertilization antigen (FA-1) DNA vaccine on fertility of female mice. *Mol Reprod Dev* 73:1473-1479, 2006.
- [30] **Boue F, Berube B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R.** Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein. *Biol Reprod* 51:577-587, 1994.
- [31] **Boue F, Sullivan R.** Cases of human infertility are associated with the absence of P34H an epididymal sperm antigen. *Biol Reprod* 54:1018-1024, 1996.
- [32] **Sullivan R, Legare C, Villeneuve M, Foliguet B, Bissonnette F.** Levels of P34H, a sperm protein of epididymal origin, as a predictor of conventional in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 85:1557-1559, 2006.
- [33] **Furlong LI, Hellman U, Krimer A, Tezon JG, Charreau EH, Vazquez-Levin MH.** Expression of human proacrosin in *Escherichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol Reprod* 62:606-615, 2000.
- [34] **Abou-Haila A, Tulsiani DR.** Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379:173-182, 2000.
- [35] **Gong X, Dubois DH, Miller DJ, Shur BD.** Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269:1718-1721, 1995.
- [36] **Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW.** Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 38:235-244, 1988.
- [37] **Michaut M, Tomes CN, De Blas G, Yunes R, Mayorga LS.** Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9996-10001, 2000.

- [38] **De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS.** Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol* 3: e323, 2005.
- [39] **Tomes CN, Roggero CM, De Blas G, Saling PM, Mayorga LS.** Requirement of protein tyrosine kinase and phosphatase activities for human sperm exocytosis. *Dev Biol* 265:399-415, 2004.
- [40] **Marin-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez-Echeverria F, Blaquier JA, Miranda PV, Tezon JG.** Effect of antisperm antibodies present in human follicular fluid upon the acrosome reaction and sperm-zona pellucida interaction. *Am J Reprod Immunol* 50:209-219, 2003.
- [41] **Schuffner AA, Bastiaan HS, Duran HE, Lin ZY, Morshedi M, Franken DR, Oehninger S.** Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid. *Mol Hum Reprod* 8:722-727, 2002.
- [42] **Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ.** Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of [Ca(2+)](i) oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem* 279:46315-46325, 2004.
- [43] **Marin-Briggiler CI, Tezon JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH.** Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril* 77:252-259, 2002.
- [44] **Marin-Briggiler, C. I., Gonzalez-Echeverria, F., Buffone, M., Calamera, J. C., Tezon, J. G., Vazquez-Levin, M. H.:** Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 79:1396-1403, 2003.
- [45] **Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barratt CL, Publicover SJ.** Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl* 23:306-315, 2002.
- [46] **Breitbart, H.:** Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol* 49:321-327, 2003.
- [47] **Liu DY, Baker HW.** Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol Reprod* 48:340-348, 1993.
- [48] **Vazquez-Levin MH, Furlong LI, Veaute C, Ghiringhelli PD.** An overview of the proacrosin/acrosin system in human spermatozoa. En: *Endocrinologia molecular. Reventós J (editor), Proceedings de la Societat Catalana de Biologia. Barcelona (España).* vl 56, pp. 1-16, 2005
- [49] **Nayernia K, Adham IM, Shamsadin R, Muller C, Sancken U, Engel W.** Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol Hum Reprod* 8:434-440, 2002.
- [50] **Mari S, Rawe V, Biancotti JC, Charreau EH, Dain L, Vazquez-Levi MH.** Biochemical and molecular studies of the proacrosin/acrosin system in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril* 79:1676-1679, 2003.
- [51] **Primakoff P, Myles DG.** Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS Lett*, 581:2174-2180, 2007.
- [52] **Rubinstein E, Ziyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C.** The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 17:254-263, 2006.
- [53] **Frayne J, Hurd EA, Hall L.** Human tMDC III: a sperm protein with a potential role in oocyte recognition. *Mol Hum Reprod* 8:817-822, 2002.
- [54] **Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M.** The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434:234-238, 2005.
- [55] **Hayasaka S, Terada Y, Inoue N, Okabe M, Yaegashi N, Okamura K.** Positive expression of the immunoglobulin superfamily protein IZUMO on human sperm of severe male infertile patients. *Fertil Steril*, 88:214-216, 2007.
- [56] **Ziyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP.** CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci* 119:416-424, 2006.