

Multimed 2018; 22 (6)

NOVIEMBRE-DICIEMBRE

ARTICULO DE REVISIÓN

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE GRANMA

Fecundación Humana. Aspectos moleculares. Revisión Bibliográfica

Human Fertilization. Molecular aspects. Bibliographic review

Esp. Embriol. Rafael Gutiérrez Núñez,¹ Est. Med. Beatriz María Gutiérrez Alarcón.¹

¹. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Manzanillo. Granma, Cuba.

RESUMEN

La fecundación es proceso complejo y crucial en el desarrollo humano. La interacción entre el oocito secundario y el espermatozoide transforman dos células diferenciadas en un cigoto totipotente. Distintas proteínas de la superficie celular de ambas células sexuales han sido identificadas en la unión y fusión de los gametos. La interacción comienza con la adhesión del espermatozoide a la zona pelúcida. Esta unión es mediada por la proteína SED-1 y/o la unión de la galactosil transferasa (GalT-I), a las cadenas de glúcidos de la zona pelúcida (ZP3) lo que conlleva a la reacción acrosómica. El conocimiento de las moléculas y los mecanismos responsables de estos procesos permite una mejor comprensión de las interacciones oocito II – espermatozoide, lo que permitirá la regulación de la fertilidad y el desarrollo de nuevos métodos de reproducción asistida solucionando problemas de infertilidad.

Palabras Clave: Fecundación, Oocito, Espermatozoide, Oocitación, Reacción acrosómica.

ABSTRACT

Fecundation is a complex and crucial process in human development. The interaction between the secondary oocyte and the spermatozoon transforms two differentiated cells into a totipotent zygote. Different proteins of the cell surface of both sex cells have been identified in the union and fusion of the gametes. The interaction begins with the adhesion of the spermatozoon to the zona pellucida. This binding is mediated by the SED-1 protein and / or the binding of galactosyl transferase (GalT-I), to the sugar chains of the zona pellucida (ZP3), which leads to the acrosome reaction. The knowledge of the molecules and the mechanisms responsible for these processes allows a better understanding of oocyte II - sperm interactions, which will allow the regulation of fertility and the development of new assisted reproduction methods solving infertility problems.

Keywords: Fecundation, Oocyte, Spermatozoon, Oocitation, Acrosome reaction

DESARROLLO

Fecundación.

Es un proceso complejo, crucial y fascinante en el desarrollo humano, donde ocurren cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos, existiendo una interacción entre ambas células sexuales (*gametos: oocito secundario y espermatozoide*); con la consiguiente fusión y mezcla de los caracteres hereditarios maternos y paternos, originando al huevo o cigoto totipotente, es decir, la formación de un nuevo individuo. Este proceso de Fertilización en la especie humana es interno y ocurre a nivel de las tubas uterinas en su tercio externo o región ampular.

La fecundación, más que un simple proceso, son varios que se inician cuando el esperma comienza a penetrar la corona radiada y la zona pelúcida, y termina con la mezcla de los cromosomas maternos y paternos, después que el espermatozoide ha penetrado en el oocito. Según Valdés en dicho proceso se describen las fases siguientes:

- ✓ Penetración a la corona radiada.
- ✓ Unión y penetración a la zona pelúcida.
- ✓ Unión y fusión de espermatozoide a la membrana celular del oocito.
- ✓ Prevención de la poliesperma.
- ✓ Activación metabólica del huevo.
- ✓ Descondensación del núcleo del espermatozoide (pronúcleo masculino).
- ✓ Completamiento de la meiosis.

- ✓ Desarrollo del pronúcleo femenino.
- ✓ Contacto de los pronúcleos y mezcla de los cromosomas maternos y paternos.
Formación del huevo o cigoto.
- ✓ Organización y preparación para la primera división mitótica.
- ✓ Segregación citoplasmática antes del clivaje.

Antes de ocurrir este importantísimo proceso que permite la perpetuación de la especie, suceden una serie de eventos previos a nivel de los genitales femeninos y masculinos que garantizan que el encuentro de las células sexuales acontezca de manera armónica una vez que han sido transportados desde sus sitios de origen.

GÉNESIS Y TRANSPORTE DE LOS GAMETOS:

Oocito secundario:

La célula sexual femenina (oocito secundario) debe de ser transportada desde el ovario hasta el sitio de encuentro con el espermatozoide, por lo que es imprescindible destacar algunos eventos que suceden en la mujer en su ciclo sexual.

Desde el principio de la pubertad, hasta el climaterio, la mujer experimenta normalmente modificaciones cíclicas en las que participan el Hipotálamo, la Hipófisis, el ovario y el útero, denominados en su conjunto ciclo sexual femenino.¹

Consiste en la maduración de un grupo de folículos primordiales y la expulsión periódica de un oocito; son los cambios cíclicos del ovario que reciben el nombre de ciclo ovárico. Este evento se repite cíclicamente en un período aproximado de 28 días.

La actividad de la Hipófisis es controlada por el Hipotálamo que produce la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), y un eje hipotálamo-hipófisis-gónada es el responsable por los cambios cíclicos.¹

Esta importante hormona (GnRH), es elaborada por las neuronas neurosecretoras del núcleo arqueado del hipotálamo, su liberación ocurre de manera intermitente cada 90 minutos aproximadamente y su vida media en sangre es de 2-4 minutos, esta hormona hace que se libere también de manera intermitente la FSH (Hormona Folículo Estimulante) y la LH (Hormona Luteinizante) por las células basófilas de la adenohipófisis,² estas dos últimas

hormonas juegan un papel primordial garantizando que ocurra la fertilización en óptimas condiciones.

La FSH y la LH inician los cambios cíclicos en el ovario al inicio de la pubertad y continúan su regulación durante la vida sexual de la mujer estimulando al ovario a producir estrógeno y progesterona, siendo responsables además del ciclo uterino incluyendo la menstruación.¹ La concatenación de ambos ciclos (ovárico y uterino) prepara al sistema reproductor para la Gestación.

Los ovarios están localizados en la cavidad pélvica, a ambos lados del útero, por debajo de las tubas uterinas y por detrás del ligamento ancho del útero en un pliegue peritoneal llamado mesovario por el que discurren los vasos sanguíneos que se introducen en el ovario a través del hilio; es un órgano con forma amigdalar y ligeramente aplanado cuyas medidas aproximadamente son de 2.5 - 3 cm de longitud, 1,5 cm de ancho y 1cm de espesor, cubierto por una capa de epitelio cilíndrico bajo. Es en él donde ocurre el proceso de oocitación.

El oocito II es una gran célula esférica que alcanza aproximadamente 25µm de diámetro y que aparece rodeada por varias capas de células foliculares planas. Su núcleo es pálido y excéntrico conteniendo un nucléolo prominente observándose en él los cromosomas meióticos en el nucleoplasma.³

Este oocito secundario dentro de su envoltura o membranas presenta la Zona Pelúcida (ZP), la cual, juega una gran importancia en el proceso de fecundación incluyendo la unión especie-específica del oocito y el espermatozoide, entre otras,⁴ ella es una matriz extracelular transparente, que rodea al oocito, constituye una capa homogénea que separa al oolema de la región interna de las células foliculares, la corona radiada. Prolongaciones celulares de estas células atraviesan la zona pelúcida, y forman con la membrana plasmática del oocito los puentes celulares (gap junctions).⁵

La misma tiene un grosor aproximado de 15-20 µm; con estructura amorfa, con un aspecto de entramado fibrilar, estas fibras o filamentos están formados por las diferentes glicoproteínas; mediante microscopía de luz polarizada se distinguen por su morfología tres capas: una zona interna donde los filamentos se orientan radialmente, una zona externa donde los filamentos se orientan tangencialmente y una zona intermedia que exhibe un

cierto desorden. La superficie externa ZP presenta una apariencia de "queso suizo" mientras que la superficie interna muestra una apariencia regular y rugosa. ⁴ La zona pelúcida a su vez está formada por filamentos compuestos de dímeros de glicoproteínas denominadas de forma genérica ZP1 (200 mil PM), la ZP2 (120 mil PM), ZP3 (83 mil PM), ² siendo la ZP1 la de menor movilidad y la ZP3 la de mayor movilidad; habiéndose descrito recientemente la ZP4 (también denominada avilesina, en honor a su descubridor) en la especie humana, en ratas y hámster, gracias al uso de técnicas muy sensibles como el MALDI-TOF. ⁴ La ZP4 tiene un extremo N-terminal con una secuencia señal, un dominio celular a ZP muy conservado y un dominio transmembrana C-terminal. ⁶

Estas proteínas son presumiblemente secretadas por el oocito; ³ así, la ZP estaría formada por filamentos compuestos de dímeros de las glicoproteínas ZP2:ZP3 y estos filamentos estarían unidos entre sí por dímeros de la glicoproteína ZP1. ^{1,4}

Al comenzar cada ciclo ovárico de 5 a 15 folículos primordiales comienzan a crecer bajo la influencia de la Hormona Folículo Estimulante, en condiciones normales solo uno de estos folículos alcanza su madurez total y expulsa únicamente un oocito, degenerando los demás y convirtiéndose en folículos atrésicos. En el ciclo siguiente comienza a crecer otro grupo de folículos y también en este caso solo uno llega a la madurez. En consecuencia, la mayor parte de los folículos degeneran sin llegar a la madurez completa. Cuando un folículo se torna atrésico, el oocito y las células foliculares adyacentes degeneran y son sustituidos por tejido conectivo, lo cual forma el cuerpo atrésico.

La FSH también estimula la maduración de células foliculares (granulosas) que rodean al oocito. La proliferación de estas células está mediada por el factor de diferenciación de crecimiento-9, (GDF-9), familia del Factor de Crecimiento Transformador β (TGF- β), ⁷ y a la actividad proliferativa de estas células se debe a la molécula de señalamiento-activina- producida por el oocito I. ²

Las células granulosas y tecaes, que actúan en conjunto elaboran estrógenos que:

- a) Hacen que el endometrio uterino entre en la fase proliferativa o folicular.
- b) Generan fluidez del moco cervical para permitir el pasaje de los espermatozoides.
- c) Estimulan la hipófisis para que libere hormona luteinizante.

A mitad del ciclo hay un aumento brusco de LH que:

- ✓ Eleva las concentraciones del factor promotor de la maduración que lleva al oocito a reanudar y completar la meiosis I y a iniciar la meiosis II.
- ✓ Estimula la producción de la progesterona por células estromales foliculares(luteinización)
- ✓ Provoca la ruptura folicular y la oocitación. ⁷

En los días previos a la oocitación y bajo la acción de la FSH y la LH, el folículo de De Graaf crece rápidamente hasta alcanzar un diámetro de 15 mm, en coincidencia con el desarrollo final de este folículo, que además del aumento súbito de la LH ocurre la liberación de un Factor Local, la sustancia inductora de la meiosis, bajo la influencia de la misma el oocito primario que hasta el momento permanecía en la fase de diploteno reanuda y termina la primera división de meiosis. ^{2, 4} El oocito secundario recién formado llega hasta la segunda división de meiosis y se detiene en la metafase. ²

El primer signo de la inminencia de la oocitación es la aparición de una zona pálida ovalada en el polo externo protruyente del folículo. El cambio de color y transparencia de esta zona, que se llama estigma o mácula pelúcida se debe a la interrupción local del flujo sanguíneo en los capilares de la teca interna. Al poco tiempo aparecen soluciones de continuidad en su epitelio y en el tejido conjuntivo de la túnica albugínea y el delgado estigma protruye al exterior formando una vesícula clara. ³

La oocitación inicia con la pubertad y cesa con la menopausia, puede ocurrir a los 14 ± 2 días iniciada la menstruación. Es la expulsión, desde el interior del ovario, del oocito secundario a punto de madurar, debido a la ruptura del folículo, ¹ por un aumento excesivo de LH, estimulado por la elevada concentración de estrógenos en sangre. Además se han descrito tres factores que influyen en tan importante proceso:

- ✓ Aumento en la presión intrafolicular.
- ✓ La contracción del músculo liso de la teca externa por la estimulación de las prostaglandinas.
- ✓ Digestión enzimática de la pared folicular, este parece constituir el principal mecanismo que origina la oocitación. ⁸

Todo esto lleva consigo a un incremento del flujo sanguíneo a los ovarios y los capilares dentro de la teca externa comenzando a filtrar plasma, ocasionando edema, liberación de

histamina, prostaglandinas y colagenasa en las cercanías del folículo graafiano. ² Este folículo no es dependiente de la FSH porque produce –inhibina–, hormona que suprime la secreción de FSH por la hipófisis, esta ausencia de FSH hace que se atrofién los folículos graafianos restantes. ²

Las cantidades de prostaglandinas también aumentan en respuesta a la LH causando contracciones musculares locales en la pared del ovario las que contribuyen a expulsar al oocito junto a las células de la granulosa, proveniente del cúmulo óforos que lo rodea; de esta manera se libera y flota fuera del ovario ¹ al romperse la vesícula clara. El oocito II sale acompañado de un pequeño chorro de líquido folicular. ⁷

La ruptura folicular se debe más a la necrobiosis que a la presión, aunque ambos factores influyen. ¹

Las células que permanecen alrededor del oocito II a través de la zona pelúcida se reorganizan y forman la corona radiada. ^{1,3} En este momento de la oocitación el oocito II llega hasta a la metafase de la meiosis II. ²

En ocasiones durante la oocitación algunos de los vasos sanguíneos rotos vierten sangre a la cavidad folicular y forman un coágulo central –cuerpo hemorrágico– en la medida que los fagocitos eliminan el mismo, el aumento de la LH convierte al cuerpo hemorrágico en una estructura temporal – el cuerpo lúteo o cuerpo amarillo-. ² Este Corpus Luteum presenta una notable vascularización permaneciendo en su pared las células de la granulosa y las de la teca interna las cuales son transformadas en células luteínicas. El cuerpo amarillo en este momento se convierte en una glándula endocrina temporal que produce progesterona. Por acción de esta hormona y de las hormonas estrogénicas, la mucosa uterina entra en la fase secretora o progestacional, preparándola para la posible implantación y futuro mantenimiento del embrión. De no ocurrir la fecundación el cuerpo lúteo degenera en una o dos semanas y se denomina cuerpo amarillo de la menstruación. Si tiene lugar la fecundación, entonces se forma el cuerpo amarillo del embarazo que se caracteriza por su gran tamaño, permanece funcional por varias semanas y, después, desaparece lentamente hacia el sexto mes. ¹

Espermatozoides:

Los espermatozoides normales forman una población homogénea con estructura definida. Dentro de la cabeza se encuentra el material genético haploide; tiene forma ovoide en visión frontal y piriforme en visión lateral, ³ una longitud de 60 μm , ¹ una anchura de 2.5 a 3.5 μm ³ y presenta un movimiento muy activo. Se mueve a unos 3 mm/min a nivel de los genitales femeninos y llega entre los 30 a 60 minutos a los oviductos después de la cópula.

1

Maduración bioquímica de los espermatozoides:

Tras su formación en las paredes de los túbulos seminíferos, los espermatozoides tardan varios días en recorrer el epidídimo ⁹ que mide 7.5cm de longitud, (6m en posición estirada). ³ Los espermatozoides extraídos de las primeras porciones del epidídimo son inmóviles e incapaces de fecundar; sin embargo, una vez que los espermatozoides han permanecido en esta estructura entre 18 y 24 horas desarrollan la capacidad de motilidad, aunque diversas proteínas inhibitoras del líquido del epidídimo impiden el movimiento real hasta después de la eyaculación.

Los dos testículos forman aproximadamente 120 millones/día de espermatozoides, una pequeña cantidad se almacena en el epidídimo, pero la mayoría de ellos se almacenan a nivel de los conductos deferentes. Estos pueden almacenarse durante un mes, durante este tiempo son mantenidos en un estado de profunda inhibición bajo la acción de múltiples sustancias inhibitorias presentes en las secreciones de los propios conductos.

En la maduración de los espermatozoides juegan un papel fundamental las células de sertoli y el epitelio del epidídimo pues secretan un líquido nutritivo especial que es eyaculado junto a los espermatozoides. Dicho líquido contiene hormonas (testosterona y estrógenos), enzimas y nutrientes especiales que son esenciales para la maduración de la célula sexual masculina. Los espermatozoides atraviesan en su trayecto a las vesículas seminales que cada una de ellas anatómicamente es un tubo tortuoso, lobulado, revestido por un epitelio secretor que secreta un material mucoide rico en fructosa, ácido cítrico, fibrinógeno y prostaglandinas. Estas últimas tienen dos acciones sobre la fecundación: reaccionan con el moco cervical femenino para hacerlo más receptivo al movimiento de los espermatozoides y posiblemente desencadena contracciones peristálticas invertidas en el útero y las tubas uterinas, ayudando así al ascenso de los espermatozoides. ⁷ A nivel de las vesículas seminales es producida además la vesiculasa, enzima que coagula parte del

semen y forma un tapón vaginal que va a impedir el flujo retrógrado del semen hacia el exterior.⁸

Una vez que los espermatozoides que desde la vesícula seminal y a través del conducto eyaculador llegan a la próstata, a este nivel encuentran un líquido poco denso, lechoso que contiene ion citrato, calcio, ion fosfato, enzima de coagulación y pro-fibrinolisisina. Este líquido que se encuentra a nivel prostático es alcalino. Una proteína coagulante del líquido prostático hace que el fibrinógeno del líquido de las vesículas seminales forme un débil coágulo que mantiene el semen en las regiones profundas de la vagina. Este coágulo se disuelve durante aproximadamente los 15 a 30 minutos siguientes, debido a la lisis por acción de la fibrinolisisina formada a partir de pro-fibrinolisisina prostática.

Transporte de los gametos:

En este proceso de transporte influyen una serie de factores tanto mecánicos como hormonales. Dentro de los factores mecánicos son citados las contracciones tubo-uterinas que serán explicadas más adelante; y dentro de las hormonales tenemos el efecto de la oxitocina que es liberada durante el acto sexual y que aumenta las contracciones utero-tubáricas, la progesterona que aumenta el número de cilios de las células epiteliales de las tubas uterinas y las prostaglandinas liberadas durante el eyaculado y que su efecto fue ya explicado.

El oocito secundario que es liberado por el ovario debido a los factores antes mencionados durante la oocitación, debe ser captado por la tuba uterina, las células de su epitelio incrementan el número de cilios, así como la actividad muscular bajo influencia hormonal, se plantea que el principal factor de transporte son las contracciones de las tubas uterinas, y este ocurre en dos fases:

- ✓ Fase lenta: ocurre en la región ampular que dura aproximadamente 72 hs.
- ✓ Fase rápida, durante la cual el huevo pasa a través del istmo hacia la cavidad uterina, esta dura aproximadamente 8 horas.¹ Por mecanismos pocos conocidos, ocurre edema local o espasmo en la región del istmo durante los tres primeros días que siguen a la oocitación y el huevo es retenido temporalmente a este nivel, pero luego, debido a la influencia de la progesterona, este sitio se relaja y permite la entrada del huevo.^{1,9}

Cerca del momento de la oocitación, las fimbrias de la tuba uterina correspondiente comienza a cubrir, como un embudo, a la superficie del ovario, y la tuba se contrae de forma rítmica, el oocito II es succionada por la tuba y es transportado a lo largo de esta en dirección al útero ¹ (recinto sagrado de la vida).

En este proceso participan, tanto la acción batiente de los cilios de las células epiteliales, como los movimientos peristálticos de la musculatura de la pared tubárica. ¹

El resultado inmediato del coito es el depósito del semen en la vagina, desde aquí los espermatozoides se dirigen hacia el conducto cervical mediante el movimiento de sus colas.

¹

Una vez depositados los espermatozoides en la vagina, estos, deben de vencer una serie de obstáculos mecánicos o anatomofisiológicos (orificios cervicales, tubas uterinas), anatopatológicos (canales cervicales torcidos o comprimidos, procesos infecciosos o inflamatorios a nivel de los genitales internos femeninos; bioquímicos (pH de la uretra masculina y de la vagina, etc.)

En cada eyaculación (de 3 a 5ml), el semen contiene entre 300 y 500 millones de espermatozoides, lo que hace posible que algunos de ellos alcance el sitio de la fecundación en las tubas uterinas; mientras que mantengan la capacidad de penetrar y fertilizar. ¹

Una vez en el tracto genital femenino los espermatozoides sufren dos procesos esenciales para poder unirse a la célula sexual femenina:

- ✓ Capacitación.
- ✓ Reacción acrosómica.

La capacitación es la adquisición por el espermatozoide de la capacidad de fertilizar. En los túbulos seminíferos este gameto se observa morfológicamente maduro pero aún no es móvil y es incapaz de fertilizar al oocito, debe de pasar por el epidídimo para experimentar una maduración bioquímica, ¹ ya explicada. Normalmente requiere de 1 a 10 horas y son descritos varios factores que facilitan este proceso de capacitación:

Los líquidos o secreciones liberadas a nivel del útero y de las tubas uterinas eliminan diversos factores inhibitorios que mantenían inhibida la actividad de los espermatozoides en los conductos masculinos.

Mientras los espermatozoides permanecían en los conductos genitales masculinos, estaban continuamente expuestos a numerosas vesículas flotantes a nivel de los túbulos seminíferos que contienen grandes cantidades de colesterol.

Este colesterol estaba siendo donado de forma continua a la membrana celular que reviste el acrosoma del espermatozoide fortaleciéndola e impidiendo la liberación de sus enzimas.

Tras la eyaculación, los espermatozoides, depositados en la vagina nadan hacia arriba a través del líquido uterino, alejándose de las vesículas de colesterol y gradualmente pierden su exceso de colesterol en unas horas, al hacerlo la membrana del acrosoma queda muy debilitada. ⁹

Al liberarse de las vesículas de colesterol aumenta el pH perdiéndose carbohidratos en la superficie del espermatozoide lo que facilita el reconocimiento para las proteínas de la zona pelúcida, abriéndose los canales de calcio y al entrar este al espermatozoide junto al bicarbonato, el calcio produce AMPc facilitando entonces los eventos de fusión de membrana. ⁶

La membrana del espermatozoide se hace también mucho más permeable a los iones calcio, permitiendo la entrada de este ion abundantemente en el espermatozoide, modifica su actividad flagelar, haciendo que tenga una fuerte actividad de latiguo. Es probable que los iones calcio, causen alteraciones a nivel de la membrana celular que reviste la punta del acrosoma, haciendo que esta pueda liberar sus enzimas rápida y fácilmente. ⁹

Este proceso de capacitación fomenta la motilidad del espermatozoide y es una preparación necesaria para la reacción acrosómica, se piensa que el líquido folicular, las células de la corona radiada y el cumulus oophorus son los responsables en el logro de la capacitación y está probablemente relacionado con hormonas como el estrógeno, ¹ garantizando la quimiotaxis del espermatozoide, ⁶ mientras que la progesterona inhibe la capacitación. ¹

Reacción acrosómica: ocurre después de la unión del espermatozoide a la zona pelúcida y es inducida por proteínas de esta. Dicha reacción culmina en la liberación de enzimas necesarias para penetrar la ZP.

Almacenadas en el acrosoma hay grandes cantidades de hialorunidasa y enzimas proteolíticas. La hialorunidasa despolimeriza los polímeros de ácido hialurónico del cemento intercelular que mantiene unidas las células de la granulosa del oocito. Las enzimas proteolíticas dirigen las proteínas de los elementos estructurales de los tejidos que todavía permanecen adheridos al oocito.

Penetración del espermatozoide a la corona radiada.

Cuando se produce la oocitación, el oocito II abandona el ovario rodeado de la membrana pelúcida y la corona radiada, las células de esta última están rodeadas por una matriz extracelular de proteínas y carbohidratos, fundamentalmente ácido hialurónico. Se considera que la hialorunidasa y otras enzimas contenidas en el acrosoma desempeñan una función importante en la separación y penetración del espermatozoide, además de los movimientos mecánicos de los espermatozoides alrededor del oocito.

Unión y penetración a la zona pelúcida.

La ZP es un escudo de glicoproteínas, de estructura filamentosa, que rodea al oocito, así como también facilita y mantiene la unión del espermatozoide e induce la reacción acrosómica.¹ Las características morfológicas y su composición molecular fueron descritas con anterioridad.

La unión de la esperma a la zona pelúcida es mediada por la ZP3 y por receptores de la membrana plasmática del espermatozoide,¹ como la proteína de superficie particularmente atractiva: SED-1,¹⁰ la que sirve de llave para que el espermatozoide se una a la ZP y se fusione al oocito.⁹ Además de esta proteína se han descrito una serie de moléculas denominadas zonas adhesivas (sp 56, sp 38, P47, IAM 38) y un grupo de proteínas llamadas espermadhesivas involucradas en la unión primaria y secundarias a la ZP, aunque los ligandos de zona específicos para este grupo de moléculas no se conocen. A nivel del espermatozoide la molécula más estudiada ha sido la β -^{1,4} galactosiltransferasa (GalT- I),¹⁰ la cual reconoce específicamente el residuo de N-acetil-glucosamina de la ZP3, la misma es inactivada por la β -N-acetil glucosaminidasa presente en el acrosoma (lisosoma especializado). La GalT- I, como molécula de la membrana plasmática, puede actuar como un receptor específico de glicoproteínas incluyendo la ZP3,¹⁰ ya que esta glicoproteína tiene dos regiones, una primera región donde el receptor del espermatozoide, que reconoce proteínas integrales del plasmolema del gameto masculino y una segunda región que se une

a proteínas receptoras localizadas en la cabeza del espermatozoide y desencadena la reacción acrosómica. ²

La GalT-I es una enzima intramembranosa cuyos sitios activos miran hacia el exterior y se unen a los residuos de carbohidratos N-acetil-glucosamina de la ZP3 por acción de la β -N-acetil glucosaminidasa activa la proteína G en el espermatozoide provocando la apertura de los canales de calcio y con ello la salida por exocitosis del contenido acrosómico. ⁶

El Calcio juega un papel fundamental, ya que es necesario para la activación de enzimas que participan en la fusión de membranas, además, como ya fue mencionado, este ión también regula el proceso de hiperactivación, la quimiotaxis y la capacitación. Los espermatozoides son capaces de movilizar calcio tanto del medio extracelular como de los depósitos intracelulares, está demostrado en humanos y en ratas que el acrosoma constituye un depósito intracelular de calcio. En estudios realizados en ratas se observó que el receptor a la Zp3 se encuentra localizado sobre la región anterior de la cabeza del espermatozoide, mientras que en humanos, a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide existen al menos dos receptores distintos que se unen a la ZP, uno es un receptor acoplado a la proteína G y el otro es un receptor tirosina cinasa acoplado a fosfolipasa C. Resultados de diferentes laboratorios concluyen que durante la reacción acrosómica hay al menos dos fases de flujo del ión calcio hacia el citosol y que están implicados distintos tipos de canales de calcio. Diferentes marcadores han demostrado que el aumento de los niveles de calcio inicia en la cabeza del espermatozoide y más específicamente en el segmento ecuatorial del acrosoma. En primer lugar se produce una respuesta temprana dependiente de voltaje provocando un aumento de calcio inicial, durante un breve periodo, el cual es seguido de una elevación prolongada que se mantiene a lo largo del tiempo. Sin embargo el proceso que actúa como nexo de unión entre las dos fases de flujo de calcio Ca^{2+} permanece sin esclarecerse totalmente, aunque se ha propuesto que es el acrosoma el responsable de la liberación del calcio que se produce entre los dos eventos y que dicho calcio es acumulado a nivel del acrosoma durante la capacitación.¹⁰

Todos los ligandos conocidos para GalT-I tienen residuos N-acetil-glucosamina, sin embargo, esto no es suficiente para que una glicoproteína se una como ligando. Por ejemplo ZP1 y ZP2 tienen residuos N-acetil-glucosamina como terminales no reducidos, pero no son ligandos para GalT - I. La importancia biológica de la Galactosiltransferasa y la adhesión a la ZP3 ha sido comprobada mediante ensayos in vitro. En experimentos utilizando ZP

solubilizada se comprobó que ésta inhibe la actividad de la enzima N-acetil glucosaminidasa, sugiriendo que la ZP es reconocida por esta enzima. Cuando los residuos N-acetilglucosamina son bloqueados o eliminados de la ZP solubilizada, ésta pierde su capacidad de unirse a espermatozoides. Estos resultados sugieren que la interacción entre GalT-I y ZP3 es necesaria para la unión entre gametos. Sin embargo, parece no ser totalmente imprescindible. Esto sugiere que en la ZP de oocitos que resultan del proceso de oocitación existe otro ligando independiente de la GalT- I que permite la unión del espermatozoide a la ZP, pero que no permite la exocitosis del acrosoma, y es donde es descubierta la proteína SED-1, la cual fue aislada mediante cromatografía de afinidad en columnas de ZP; se ha demostrado que dicha proteína es capaz de unirse selectivamente a la ZP de oocitos no fecundados. Además, mediante ensayos competitivos usando SED-1 recombinante, diferentes dominios de SED-1 y anticuerpos contra la misma, se comprobó la participación de esta proteína en la adhesión del espermatozoide al oocito. Estos resultados son confirmados cuando se utilizan ratones transgénicos que no expresan SED-1 y mediante cruzamiento se observó una reducida fertilidad in vivo. Además los espermatozoides fueron incapaces de unirse a la ZP a pesar de no observarse aparentes defectos en su morfología, concentración, estado del acrosoma o motilidad. Estos mismos autores estudiaron si la supresión del gen responsable de la expresión de la proteína SED-1, podría haber provocado un efecto inesperado sobre la expresión de la GalT-I, comprobándose que ésta no se vea afectada, de modo que ambas son independientes. ¹⁰⁻¹⁶

Una vez llegado el espermatozoide a la ZP inicia la reacción acrosómica, cuyo objetivo es la unión de parte de la membrana acrosomal con la membrana citoplasmática del oocito. La liberación de enzimas acrosómicas como la acrosina, permite que el espermatozoide penetre la zona y se ponga en contacto con la membrana citoplasmática del oocito.

La permeabilidad de la ZP cambia cuando la cabeza del espermatozoide entra en contacto con la superficie del oocito. Estas enzimas, alteran las propiedades de la zona pelúcida (reacción zonal) para prevenir la poliespermia e inactivar los sitios receptores específicos ZP3 para los espermatozoides en la superficie de la ZP. Esta reacción culmina con la liberación de numerosas enzimas necesarias para penetrar la zona pelúcida, contenidas en el acrosoma y que incluye la acrosina y sustancias parecidas a la tripsina, tales como: proteína ácida, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, arilaminidasa, hialuronidasa, arilsulfatasa, neuraminidasa, colagenasa, fosfolipasa C, esterasa y la proacrosina. ¹

Valdés plantea que la reacción acrosómica se puede resumir en los eventos siguientes:

- ✓ Contacto con la zona pelúcida y lisis de la membrana del acrosoma, con salida de los gránulos acrosómicos (espermolisinas).
- ✓ Las membranas que cubren al huevo se hacen más blandas y menos densas, en el lugar de contacto con el espermatozoide.
- ✓ Formación de la prolongación membranosa del acrosoma.
- ✓ Formación de los túbulos acrosómicos que contactan con la membrana citoplasmática del oocito.
- ✓ En el sitio de contacto de las membranas, estas se disuelven y los túbulos acrosómicos se unen al citoplasma del oocito.
- ✓ El núcleo (cabeza) y el centriolo del espermatozoide penetran al oocito a través de los túbulos acrosómicos.

Unión y fusión del espermatozoide a la membrana celular del oocito.

Tras la reacción acrosómica se provoca una remodelación de la superficie del espermatozoide, quedando expuesta la membrana acrosomal interna que contactará con las microvellosidades del oocito. La interacción se inicia por una primera unión lábil y a continuación tiene lugar la adhesión celular propiamente dicha entre los dos gametos, para culminar con la fusión de las dos membranas. ¹⁰

Numerosos estudios implican a varias moléculas a nivel del espermatozoide y del oocito como responsables de la interacción, los mismo sugieren que la unión espermatozoide-oolema es el resultado de la adhesión de las integrinas del oolema y sus ligandos presentes en la membrana del espermatozoide. Las proteínas espermáticas que participan en este proceso presentan homología con las desintegrinas, una familia de moléculas conocidas, como *ADAM* entre las que se destaca la proteína 1 secretora rica en cisteína, *CRISP 1*, fertilina α *ADAM1*, fertilina β *ADAM2* y ciritestina *ADAM3*. Se ha descrito además la existencia de una familia de proteínas tipo inmunoglobulinas, denominadas *IZUMO* que son necesarias para la fusión. Respecto al oolema, las sustancias implicadas en esta integración, son denominadas integrinas $\alpha 6 \beta 1$ y tetraspaninas CD9. ^{10, 11}

La fusión queda restringida a una región de cada gameto. En el espermatozoide existe una porción de membrana plasmática, denominada región o segmento ecuatorial, que cubre parte del acrosoma, pero no se fusiona con la membrana acrosomal externa durante la reacción acrosómica. En esta región es donde ocurre el contacto con el oolema y se inicia el

proceso de fusión entre ambos gametos. En el oocito la fusión se inicia a nivel de las microvellosidades presentes en la mayor parte del oolema. ^{10, 12, 17, 18}

Prevención de la poliesperma.

En esta fase se prevé y se bloquea la posible entrada de más de un espermatozoide. Valdés describe dos tipos de bloqueos, uno rápido o inmediato y otro lento, los cuales han sido investigados en diferentes tipos de animales:

- ✓ Bloqueo rápido o inmediato, estudiado en erizos de mar, consiste en una rápida despolarización eléctrica de la membrana celular del huevo, el potencial de membrana en reposo de este cambia, desde -70 mv hasta +10 mv, en unos dos o tres segundos después de la fusión del esperma y el oocito. Este cambio de potencial evita que otro espermatozoide se adhiera a la membrana ovular. Este proceso en los mamíferos dura aproximadamente 5 minutos, tiempo suficiente para que comience a progresar el bloqueo lento o duradero.
- ✓ El bloqueo lento comienza con la propagación de una de calcio Ca^{2+} desde el sitio de fusión que, en unos dos minutos ha recorrido todo el huevo y progresivamente, a medida que avanza, actúa sobre los gránulos corticales. Esto hace que los gránulos se fusionen con la membrana celular del huevo y viertan su contenido en el espacio previtelino. Los polisacáridos presentes en ese lugar y la zona pelúcida se hidratan e hinchando causando desaparición del espacio previtelino y el engrosamiento de la zona pelúcida e hidrolizan moléculas ZP3 receptoras de los espermatozoides, lo que elimina la posibilidad de entrada de nuevos espermatozoides.

La reacción cortical del oocito se puede resumir en:

- a) Engrosamiento de la ZP y separación de la superficie del huevo formándose un espacio periovular.
- b) Salida de los gránulos corticales que se encuentran en la parte periférica o superficial del huevo.
- c) Formación de nuevos gránulos corticales y comienzo de la reacción cortical que se inicia por el sitio de entrada del espermatozoide y se extiende a todo el huevo.
- d) El potencial de membrana cae, desde ligeramente negativo, pudiendo llegar hasta alrededor de $\pm 50 \mu v$, pero se restablece después de producida la reacción cortical.
- e) A partir de este momento se produce aumento de la actividad metabólica del huevo.

Activación Metabólica del huevo.

Uno de los cambios que se producen por la penetración del espermatozoide en el oocito es la rápida intensificación de la respiración y el metabolismo del huevo. Se considera como primer evento la liberación de iones calcio Ca^{2+} dentro de la célula, luego le sigue el intercambio de sodio extracelular por hidrógeno intracelular a través de la membrana plasmática, esto aumenta el pH, lo que incrementa a su vez el metabolismo oxidativo, dado por el aumento de:

- a) La necesidad y el consumo de oxígeno.
- b) Del metabolismo de carbohidratos (glucógeno).
- c) Del contenido de aminoácidos libres.
- d) De la actividad de fermentos proteolíticos.
- e) Se activa la síntesis de proteínas.

Descondensación del núcleo.

La cabeza del espermatozoide, al penetrar en el oocito, aumenta su tamaño, se redondea, muestra una estructura más laxa y se convierte en un núcleo de aspecto típico, el pronúcleo masculino. La cola se desprende y degenera.

Completamiento de la meiosis y desarrollo del pronúcleo femenino.

Después de la penetración de la cabeza del espermatozoide en el oocito secundario, se produce la expulsión del segundo cuerpo polar y los cromosomas que quedan, forman el oocito definitivo (óvulo maduro).

Contacto de los pronúcleos y mezcla de los cromosomas. Formación del huevo o cigoto.

Morfológicamente los pronúcleos masculino y femenino son indistinguibles, y al entrar en contacto pierden sus envolturas nucleares. Durante el crecimiento de estos, cada pronúcleo debe replicar su DNA, ya que solo presentan un juego simple de cromosomas (haploides).

De inmediato después de la síntesis del DNA, los cromosomas se disponen en el huso mitótico, organizado por los centriolos aportado por los espermatozoides, en preparación para la primera división mitótica del huevo o clivaje. Los 23 cromosomas maternos y los paternos se dividen longitudinalmente por el centrómero, y las cromátidas hermanas se desplazan a los polos opuestos, de manera que, proporcionan a cada célula del cigoto, un

número diploide de cromosomas. Al tiempo que en las cromátides hermanas se desplazan a los polos opuestos, un profundo surco aparece en la superficie de la célula y divide al citoplasma del cigoto en las dos primeras células, que continúan su desarrollo hasta la formación del nuevo organismo.

Al final de estos procesos y como consecuencia de la fecundación se tiene:

- ✓ El restablecimiento del número diploide de cromosomas y se establece el genoma embrionario.
- ✓ La determinación del sexo cromosómico.
- ✓ Activación del cigoto para el inicio de la segmentación o clivaje.
- ✓ Restauración y organización de los componentes citoplasmáticos (segregación citoplasmática). ¹

Segregación citoplasmática.

Inmediatamente después de la penetración del espermatozoide, comienza una intensa actividad dinámica de las partes que componen el citoplasma del óvulo (ooplasma) y que recibe el nombre de segregación citoplasmática. Durante este proceso se observa una reorganización espacial del huevo. Por eso, muchos autores denominan a este proceso morfogénesis, teniendo en cuenta que es como si prepararan las condiciones para el desarrollo morfogenético futuro.

Uno de los primeros cambios que se observan es la distribución del citoplasma del huevo en dos partes, una externa o ectoplasma, y una interna o endoplasma. En el ectoplasma muchas veces se observan pigmentos y pequeños gránulos de nutrientes. El endoplasma es rico en vitelo y otras inclusiones o gránulos de nutrientes. Esta sencilla distribución del citoplasma influye desde ese momento en el desarrollo subsiguiente. El proceso de segregación ocurre más durante la segmentación. ¹

CONCLUSIONES

Se puede afirmar que en los últimos años se han identificado varias sustancias que participan en el proceso de interacción oocito – espermatozoide, aunque este proceso, no está conocido totalmente. Todos los problemas explicados en esta revisión están implicados en el diagnóstico y/o tratamiento de la infertilidad, así como en el desarrollo de métodos novedosos en el tratamiento o regulación de la fertilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés Valdés A, Pérez Núñez H, García Rodríguez R, López Gutiérrez A. Embriología Humana. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2010.
2. Gartner L, Hiatt J. Texto Atlas de Histología. 3a ed. USA: McGraw Hill; 2008.
3. Bloom Fawcett. Tratado de Histología. 12ma ed. USA: McGraw Hill; 1996.
4. Jiménez Movilla M. Análisis de la Composición estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencia a la especie humana. [Internet] Universidad de Murcia: España; 2005 [Citado 20 enero del 2018]. Disponible en:
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/77755/TMJM.pdf?sequence=1>
5. Sinowatz F, Koelle S, Adolfo Palma G. Estructura y función de la zona pelúcida. [Internet] 2015 [Citado 20 de abril del 2018]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/266045520_ESTRUCTURA_Y_FUNCION_DE_LA_ZONA_PELUCIDA
6. Langman. Embriología Médica. 13a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2016.
7. K.L. Moore. Embriología Clínica. 10 ed. S.A. Elsevier: España; 2016.
8. Guyton y Hall. Tratado de Fisiología médica. 13 ed. Elsevier: España; 2017.
9. Cánovas S, Coy P. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. Rev Invest Clín 2008; 60(5): 403-413.
10. Álvarez Díaz J. Mecanismos de Fecundación humana. Rev Per Ginecol Obstet 2007; 53(1): 45-52.
11. Kushner Dávalos L. la fertilización in vitro: beneficios, riesgos y futuro. Rev Cient Cien Med 2010; 13(2): 77-80.

12. Ayuso Riverón M, Crespo Pupo DR, Francia Cabrera GA. Fertilización in vitro en el centro regional de atención a la pareja infértil en hospital Lenin. CCM 2017; (4): 1185-88.

13. De la Fuente A. Cómo se produce la fecundación humana. La fusión entre el óvulo y el espermatozoide, paso a paso. Natalben preconcepcivo. [Internet] 2017 [Citado 20 de enero del 2018]. Disponible en: <https://www.natalben.com/fecundacion/como-se-produce>

14. Frías Sánchez Z, Pantoja Garrido M, Sánchez Martín F. Desencadenantes de la maduración ovocitaria en ciclos de fecundación in-vitro. Rev Cubana Ginecol Obstetr 2017; 43(2): 1-11.

15. Fernández Borbón H, Gerez Mena S, Pineda Bouzon A. La reproducción asistida. Rev Ciencias Méd 2015; 19(2): 367-373.

Recibido: 19 de septiembre del 2018.

Aprobado: 23 de octubre del 2018.

Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Rafael Gutiérrez Núñez. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Manzanillo. Granma, Cuba.