



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
IZTACALA U.N.A.M.



Evidencia de un bloqueo parcial a la Polispermia  
a nivel de la Membrana Plasmática del Ovocito  
de Hamster Dorado, *Mesocricetus auratus*  
(Water).

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**B I O L O G O**

p r e s e n t a :

**Jaime Hernández Vázquez**

Los Reyes Iztacala,

Agosto de 1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con cariño y respeto...

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS AMIGOS

- A la Dra. MEREDITH GOULD-STEPHANO por la asesoría de este trabajo, por su paciencia y desinteresado apoyo...
  
- A JOSE LUIS STEPHANO por sus valiosos consejos...
  
- A MARIA EUGENIA ARRIETA por su estímulo y gran ayuda durante la conclusión del presente trabajo...
  
- Y a todos los que de alguna manera me ayudaron...

MUCHAS GRACIAS.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal que pertenece a la Unidad de -- Morfología y Función de la E.N.E.P. Iztacala bajo - la asesoría de la Dra. Meredith Gould-Stephano.

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
Maduración Epididimal.....	1
Capacitación.....	2
Reacción Acrosomal.....	3
Características del Ovocito de Mamíferos.....	3
ANTECEDENTES.....	5
OBJETIVO.....	10
MATERIAL Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	33
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS.....	36

## INTRODUCCION

La fecundación es el evento que marca el inicio de la existencia de un nuevo ser. En los mamíferos ocurre en el oviducto y consiste en la penetración del ovocito por el espermatozoide, lo cual tiene como consecuencia la transformación del ovocito (haploide) en un cigoto (diploide) y la activación metabólica iniciadora del desarrollo.

El espermatozoide de los mamíferos, cuando sale del testículo no es apto para fecundar. Los eventos por los que el gameto adquiere la cualidad de ser fecundante son: la maduración epididimal, la capacitación y la reacción acrosomal.

El ovocito de los mamíferos es ovulado en metafase de la segunda división meiótica, posee ya cubiertas ovulares (zona pelúcida y cúmulo oóforo) y desde que abandona la gónada es apto para la fecundación.

### Maduración Epididimal.

No se sabe de manera precisa, sobre todo a nivel molecular, cuáles son los cambios que ocurren en el espermatozoide durante la maduración epididimal. Se ha observado que una vez que los espermatozoides maduraron en el epidídimo adquieren movilidad y sufren cambios estructurales en la membrana plasmática contigua al acrosoma (Yanagimachi y col. 1985).

La adquisición de una movilidad progresiva parece ser -

una función dependiente del envejecimiento de los espermatozoides y no de los diferentes microambientes de las regiones particulares del epidídimo, aunque se adquiere durante el -- tránsito del gameto por las diferentes porciones de este órgano. En conejo, por ejemplo los espermatozoides pueden adquirir una vigorosa movilidad en el cuerpo del epidídimo aún si se les impide el paso hacia la cauda (estos espermatozoides no son fecundantes) (Harper, 1982).

#### Capacitación.

La capacitación consiste en una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en el espermatozoide (Yanagimachi, ---- 1981); el significado de estos cambios es a la fecha poco -- comprendido. Austin (1951) y Chang (1951) la describieron como un evento esencial que debe ocurrir en el espermatozoide de los mamíferos para que pueda penetrar en el ovocito.

En condiciones naturales, la capacitación ocurre en el tracto genital femenino (vagina, útero u oviducto).

Un signo importante de que la capacitación ha ocurrido es el cambio en el tipo de movilidad que presenta el espermatozoide (fenómeno descrito originalmente como "hiperactivación"), en el cuál el espermatozoide mueve el flagelo vigorosamente en forma de látigo (Yanagimachi, 1981).

La (s) sustancia(s) que induce(n) la capacitación in vivo no ha(n) sido determinada(s) a la fecha, pero en condiciones in vitro se ha usado albúmina en el medio capacitan--

te. Bavister (1981a) logró la capacitación de espermatozoides de hamster in vitro usando un polímero sintético (Polivinil alcohol) obteniendo buenos resultados.

#### Reacción acrosomal.

La reacción acrosomal en mamíferos consiste en la fusión en diferentes puntos de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide, haciéndose estos poros cada vez más grandes y liberándose a través de ellos el contenido acrosomal (enzimas líticas como hialuronidasa, tripsina y otras).

La importancia de la reacción acrosomal en la fertilización acrosomal de mamíferos fué reconocida originalmente por Austin y Bishop en 1958 (citado por Yanagimachi, 1982), quienes reportaron que el acrosoma de espermatozoides móviles de hamster y cobayo se modifica y después se pierde el contenido acrosomal cuando el espermatozoide comienza a penetrar la zona pelúcida.

#### Características del ovocito de mamíferos.

El ovocito de los mamíferos se distingue del de otros animales en cuanto a las cubiertas ovulares que posee; estas cubiertas ovulares son: la zona pelúcida, una cubierta de glucoproteínas (Austin, 1982) ó mucopolisacáridos (Baker, 1982), sintetizada al menos en parte por el ovocito (Bleil y Wassarman, 1980b, 1980c, Greve y col., 1982). La otra cubierta ovular se forma por la proliferación de las cé

lulas foliculares y constituyen la corona radiata y el cúmulo oóforo, las cuales rodean al ovocito y lo nutren durante su desarrollo (Baker, 1982).

La meiosis del ovocito de mamíferos se encuentra detenida característicamente en dictiocteno de la profase I, reanudándose poco antes de que la ovulación ocurra y deteniéndose nuevamente en metafase II, no concluyendo la meiosis hasta - después de la fertilización, por tanto un ovocito "maduro" - de mamífero lo observamos con su zona pelúcida y un solo --- cuerpo polar en el espacio perivitelino. Una evidencia de -- fertilización en estos organismos es la presencia de dos --- cuerpos polares en el espacio perivitelino (Bavister, ----- 1981b).

## ANTECEDENTES

La polispermia es la entrada de más de un espermatozoide al ovocito y cuando ocurre en mamíferos conduce a una embriogénesis atípica y a una muerte temprana del embrión (Austin, 1965). Es por eso que para los mamíferos resulta de suma importancia la existencia de mecanismos que impidan la penetración de espermatozoides supernumerarios en el ovocito.

Debido al difícil acceso de los gametos de mamífero en su medio ambiente natural, se ha recurrido al desarrollo de técnicas de fertilización en condiciones de laboratorio (fertilización in vitro que nos permiten investigar dicho fenómeno).

Las circunstancias naturales que reducen y evitan la polispermia son: (Wolf, 1981) a) La relativamente pequeña cantidad de espermatozoides que llegan al sitio de la fertilización, b) El efecto protector de las células del cúmulo oóforo que envuelven al ovocito y c) El bloqueo del ovocito "per se" que se establece a nivel de la zona pelúcida y la membrana plasmática.

Con respecto al último punto, se ha concluido (Austin y Braden, 1956) que los mamíferos parecen tener dos mecanismos independientes que protegen contra la polispermia, uno a nivel de la zona pelúcida denominado reacción de zona y otro a nivel de la membrana plasmática.

La reacción de zona consiste en la liberación al espacio perivitelino del contenido de los gránulos acrosomales poco después de la penetración del espermatozoide fertilizante; estos gránulos se encuentran en el citoplasma del ovocito y en algunas especies la presencia de su contenido en el espacio perivitelino evita la fusión de espermatozoides supernumerarios (Schuel, 1978).

El bloqueo a la polispermia a nivel de la membrana plasmática puede ser temporal o permanente en las especies que lo presentan. En este tipo de bloqueo las membranas plasmáticas del ovocito y de los espermatozoides supernumerarios están muy cercanas pero no existe fusión (Gould-Somero y Jaffe, 1984).

Austin y Braden (1956) realizaron observaciones de ovocitos fertilizados in vivo en varios grupos de animales y concluyeron que en algunas especies (perro y carnero) raramente se encuentran espermatozoides supernumerarios en el espacio perivitelino (entre la membrana plasmática y la zona pelúcida), lo que sugiere que la reacción de zona es altamente desarrollada en estos organismos, es decir existe un bloqueo primario a la polispermia a nivel de la zona pelúcida. En otras especies (conejo, topo y probablemente tuza) se han observado espermatozoides supernumerarios afuera y adentro del espacio perivitelino de cigotos monospermicos, lo que hace pensar en un bloqueo primario a nivel de la membrana plasmá-

tiña; se ha considerado un tercer grupo intermedio entre los dos anteriores, aquí hay presencia ocasional de espermatozoides en el espacio perivitelino (ratón, rata, hurón y gato) - lo que sugiere la presencia de los dos procesos anteriores estableciendo bloqueos parciales a la polispermia a los dos niveles (zona pelúcida y membrana plasmática).

En el caso del hamster, Austin y Braden (1956) observaron que de 725 ovocitos fertilizados in vivo 1.6% presentaron polispermia (2 espermatozoides) pero en ninguno de esos 725 ovocitos penetrados se encontraron espermatozoides suplementarios en el espacio perivitelino, por lo que el hamster estaría colocado en el primer grupo de los descritos anteriormente o sea existe un bloqueo muy efectivo a nivel de la zona pelúcida.

Posteriormente en experimentos in vitro, se observó -- que los ovocitos desnudos de hamster (sin células del cúmulo y sin zona pelúcida), fueron muy susceptibles a la polispermia apoyando la conclusión arriba mencionada. (Hirao y Yanagimachi, 1978, 1979; Barros y Yanagimachi, 1972; Yanagimachi, 1981; Wolf, 1981). Además se ha encontrado que el ovocito de hamster no tiene un bloqueo eléctrico a la polispermia (Miyasaki e Igusa, 1981). Este tipo de bloqueo que actúa a nivel de la membrana plasmática se ha observado en otros organismos como invertebrados y anfibios (Gould-Somero y Jaffe, --- 1984), en este tipo de bloqueo el espermatozoide fertilizan-

te provoca un cambio en el potencial de membrana del ovocito impidiendo de esta manera la fusión de espermatozoides super numerarios.

No obstante que los ovocitos desnudos se tornan polispermicos y además no tienen bloqueo eléctrico, es posible -- que el primer espermatozoide que penetra al vitelo inicie un bloqueo parcial no eléctrico a nivel de la membrana plasmática que reduce la posibilidad de más penetraciones.

En 1982, Binor y colaboradores abordaron esta posibilidad realizando experimentos de reinseminación para ver si -- existía un bloqueo parcial a nivel de la membrana plasmática; usaron espermatozoides de ratón argumentando la "limitada viabilidad" de los gametos de hamster en cultivo y aprovechando la habilidad del espermatozoide de ratón para fusionarse con los ovocitos desnudos de hamster. Ellos realizaron tres tipos de experimentos: un grupo con una inseminación a baja concentración de espermatozoides (suficiente para fertilizar a los ovocitos con un bajo grado de polispermia); un -- segundo grupo inseminado con la misma baja concentración que el primero pero además reinseminado con una concentración mayor de espermatozoides de una a cuatro horas después de la -- primera inseminación y un tercer grupo inseminado directamente con alta concentración de espermatozoides. Ellos suponen que si existiera un bloqueo parcial los ovocitos del grupo -- dos serían penetrados por menos espermatozoides durante la -- reinseminación que los del grupo tres.

En dos experimentos encontraron que los ovocitos del -- grupo dos presentaron menor grado de polispermia que los ovocitos del grupo tres. Para ellos los resultados indican que no existe un bloqueo fuerte a la polispermia a nivel de la - membrana plasmática, dado que más espermatozoides penetraron en el grupo dos que en el grupo uno. Sus resultados no permiten una conclusion sobre la existencia de una bloqueo par--- cial, dado que persiste la duda de que si los gametos se de- terioran durante el tiempo de cultivo y que por esta razon - hubieran penetrado menos en el grupo dos que en el grupo --- tres.

Posteriormente Menezes y Peter (1985) probaron la pene- tración de espermatozoides en ovocitos desnudos de hamster; un grupo de ovocitos fertilizados in vivo, removidos del ovi- ducto y desnudados, fueron refertilizados in vitro por esper- matozoides humanos; los ovocitos del grupo control recibie-- ron el mismo tratamiento, pero no fueron fertilizados in vi- vo. Un alto porcentaje de los ovocitos no fertilizados fue-- ron penetrados por espermatozoides humanos in vitro. En cam- bio de los ovocitos previamente fertilizados in vivo, casi - ninguno fué penetrado por espermatozoides humanos, sugirien- do que existe un bloqueo a nivel de la membrana plasmática.

Resulta difícil interpretar estos experimentos dado que los autores dan pocos detalles; pero aún si la interpreta--- ción de los resultados fuera confiable, queda el problema de

que si la regulación de la entrada de espermatozoides de -  
otras especies es semejante a la que opera con espermatozoi-  
des homólogos.

Hemos realizado experimentos logrando mantener esperma-  
tozoides de hamster con capacidad de fertilizar ovocitos du-  
rante periodos por arriba de 6 horas en cultivo, tiempo más  
que suficiente para llevar a cabo experimentos de reinsemina-  
ción y penetración de espermatozoides.

El estudio de los mecanismos que rigen la fusión y pe-  
netración al ovocito de hamster es importante debido princi-  
palmente a que nos ayuda a comprender mejor el mecanismo de  
bloqueo de polispermia en mamíferos y entre otras razones al  
hecho de que los ovocitos de esta especie a diferencia de --  
los de otros mamíferos, son susceptibles a la penetración de  
espermatozoides heterólogos por lo que se les ha usado en --  
pruebas de "fertilidad" de espermatozoides humanos. (Forster  
y col., 1983; Prasad, 1984; Ausmanas, 1985 ).

#### OBJETIVO

Determinar si existe un bloqueo parcial a la polisper-  
mia a nivel de la membrana plasmática del ovocito de hams-  
ter.

## MATERIAL Y METODOS

Para resolver la pregunta anteriormente planteada se -- utilizó la técnica de fertilización in vitro descrita por -- Yanagimachi (1982) y Bavister (1984), que consiste en lo siguiente:

El medio de cultivo usado durante todos los experimen-- tos fué una modificación de la solución Tyrode (Paul, 1975) denominado como m-TALP, originalmente descrito por Bavister y Yanagimachi (1977) y posteriormente modificado por Yanagimachi en 1982 y también usado por Juetten y Bavister en ---- 1983. La composición del medio se muestra en la tabla I.

Se preparan las sales inorgánicas (hasta Bicarbonato de Sodio más el rojo fenol) y esta solución se almacenó a 4°C - hasta por dos semanas para los experimentos realizados en -- ese lapso; es importante agregar los reactivos en el orden - en que están en la tabla asegurandose que el primero estuvo bien disuelto antes de agregar el segundo y así sucesivamente para evitar precipitaciones.

Los componentes orgánicos se preparan en dos soluciones 100X; Glucosa, Lactato de Sodio, y Piruvato de Sodio y por - separado Taurina y Epinefrina, almacenados a -20°C hasta una semana; el efecto de estos dos componentes sobre la fertilización in vitro fué discutido por Lorraine y Bavister ----- (1981). La Albúmina Sérica Bovina es agregada inmediatamente

antes de iniciar el experimento. El medio una vez preparado no se puede guardar dado que cambian sus propiedades, oxidándose los componentes orgánicos y volviéndose letales para -- los gametos.

Tabla I. Composición del medio m-TALP.

	mg/100ml	mM/lit
NaCl	590	101.02
KCl	20	2.68
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	26.5	1.8
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10	0.49
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5	0.36
NaHCO <sub>3</sub>	150	35.7
D+Glucosa	81	4.5
Na-Piruvato	1	0.09
Na-Lactato*	0.15 ml	0.9
Taurina	6.3	0.5
L-Epinefrina	0.9	0.05
Rojo Fenol	1	
BSA**	3 mg/ml final	

\* Jarabe al 60%

\*\* Albúmina Sérica Bovina fracción V libre de ácidos grasos (Sigma Chemical).

El cultivo de los gametos se realizó en una incubadora (Thermolyne Sybron) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> - en aire para conservar el pH aproximadamente entre 7.3 y -- 7.4 (para una explicación acerca del sistema amortiguador - CO<sub>2</sub>-Bicarbonato, ver Bavister, 1985). La coloración que le dá al medio el rojo fenol nos dá una indicación del pH ade-- cuado (color naranja), y así saber si es necesario suminis-- trar más CO<sub>2</sub> para bajarlo si está rojo o morado, o suminis-- trar menos para subirlo si es que está amarillo; el disposi-- tivo usado para la incubación se muestra en la Fig. 1.

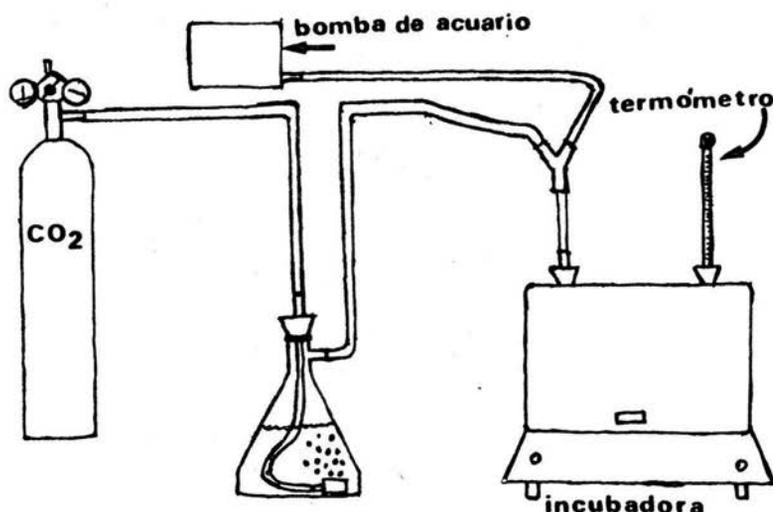


Figura 1. Esquema que muestra el dispositivo para suministrar la atmosfera de CO<sub>2</sub> en aire a la incubadora.

El burbujeo del  $\text{CO}_2$  en el matraz Kitasato nos dá una idea de la cantidad que se debe aplicar para tener una proporción aproximada de 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire (para agregar este último se usó una bomba de acuario) la mezcla es burbujeada en un recipiente con agua destilada dentro de la incubadora para proveer también humedad.

Los espermatozoides fueron recobrados de la cauda del epidídimo de un hamster macho sexualmente maduro, sacrificado con sobredosis de eter, el epidídimo es expuesto por incisión en el escroto, disecado y puncionado en varios sitios, exprimiendo y recobrando con pipeta Pasteur previamente humedecida en medio de cultivo y colocando rápidamente los espermatozoides en una caja de Petri (Falcon Petri Culture Dish - 35 x 10 mm) con aproximadamente 3 ml de medio de cultivo. Se permitió la dispersión de los espermatozoides en todo el medio de cultivo (una buena muestra no debe tardar más de dos minutos sin que esto ocurra). Se hicieron evaluaciones del porcentaje de espermatozoides móviles tomando una pequeña muestra y observando con microscopio de contraste de fase a 400X. Muestras que presentaban un porcentaje de espermatozoides móviles arriba de 75 fueron consideradas adecuadas; posteriormente se contó la concentración de espermatozoides móviles y se hicieron las diluciones necesarias para tener en la caja entre  $1-2 \times 10^7$  espermatozoides por ml; se dejó en la incubadora durante tres horas para conseguir la capacita-

ción y el inicio de la reacción acrosomal.

Mientras se capacitan los espermatozoides, se prepara el material para la extracción de los ovocitos.

Los ovocitos son extraídos de hembras maduras sexualmente por superovulación mediante la administración intraperitoneal de 60 unidades de Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada (PMSG) para inducir la maduración de los folículos y 48--56 horas después se administró por la misma vía 60 i.u. de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) para provocar la ruptura de los folículos (ovulación), la cantidad de hormona se eligió experimentalmente probando diferentes concentraciones y administrando la que funcionó mejor, debido a que durante la liofilización (ver abajo), perdió algo de su actividad.

Debido a que las hormonas vienen liofilizadas en presentaciones de 2500-2560 i.u. por mg. se presentaba el inconveniente de que por ejemplo si para un experimento se usaban tres hembras se necesitaba un poco más de 180 i.u. y lo mínimo que pudimos pesar en la balanza analítica fué 1 mg de hormona (2500-2560 i.u.) el resto tenía que ser desechado dado que una vez reconstituidas en el vehículo apropiado (NaCl -- 0.9% o agua destilada para PMSG y HCG respectivamente) pierden su actividad en poco tiempo, por lo que se desperdiciaba una gran cantidad de hormona. Para resolver este problema se reconstituyó 1 mg de hormona en 1 ml de vehículo y posteriormente se hicieron 25 alícuotas de 40  $\mu$ l cada una para tener

100 unidades de hormona por alicuota y se reliofilizaron, para ahora si poder almacenarse; así por ejemplo para inyectar 60 i.u. a una hembra, se reconstituyó una alicueta con 167- $\mu$ l de agua destilada para poder tener las 60 unidades en 100  $\mu$ l (0.1 ml). Estas alicuotas se almacenaron por lo menos durante dos meses sin que la hormona perdiera actividad.

Las hembras se sacrificaron por sobredosis de eter a -- 16-18 horas post-HCG. Se hizo una incisión en la línea media ventral y se expuso el útero con el oviducto y el ovario. Se cortó la porción distal del útero junto con el oviducto y el ovario de cada lado, se limpió totalmente de grasa, se secó con papel absorbente y se colocó en una caja de petri con -- aproximadamente 3 ml de medio; los ovocitos junto con la masa de células foliculares que forman el cúmulo oóforo fueron recobrados de la porción más dilatada del oviducto (ámpula) rompiendo la pared de éste con unas pinzas de relojero bajo el microscopio estereoscópico (63X), Fig. 2.

Para el posterior manejo de los ovocitos se usaron pipetas Pasteur de poro fino (aproximadamente 500  $\mu$ m para masa de cúmulo-ovocitos y de 110-120  $\mu$ m para ovocitos libres de cúmulo); para lograr esta punta fina las pipetas se estira--ron con flama baja, la pipeta se conectó a un tubo de goma y en el otro extremo del tubo se colocó una boquilla para manejar con la boca, aspirando para subir los ovocitos a la pipeteta y soplando suavemente para bajarlos, los ovocitos no debieron estar en contacto con el aire para no dañarlos y el -

proceso de transporte de los ovocitos se realizó siempre bajo el microscopio estereoscópico para no perderlos de vista.

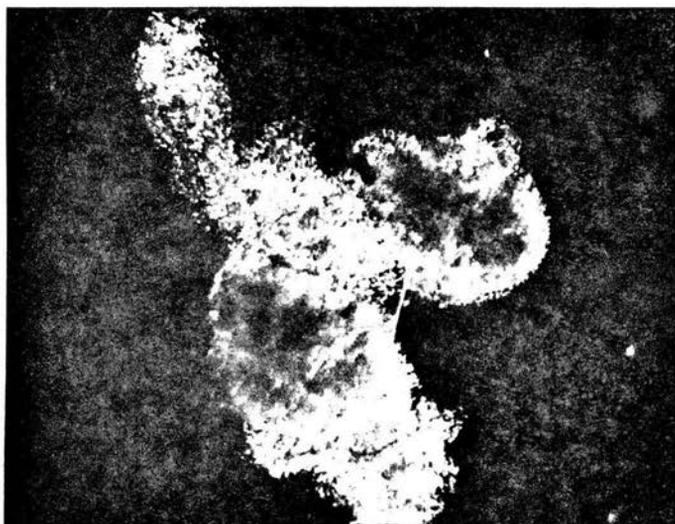


Figura 2. Fotografía a microscopio estereoscópico que muestra la masa de cúmulo-ovocitos tal como salen al romper la ámpula (100X).

Los ovocitos fueron despojados de las células foliculares incubando la masa de cúmulo-ovocitos de 1 a 2 minutos en una gota de hialuronidasa (Sigma Chemical) (1 mg/ml de medio de cultivo) de 100  $\mu$ l en una caja de Petri bajo aceite mineral previamente lavado y equilibrado con solución salina e incubado a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante una hora por lo menos.

El lavado del aceite se realizó antes de cada experimento colocandolo en un embudo de separación y agregando aproximadamente 3 veces el volumen de solución salina, se agitó vigorosamente y se permitió la separación de las fases para sacar la solución salina, esto se realizó tres veces, posteriormente se centrifugó el aceite a 2000 rpm durante 5 minutos para eliminar el exeso de solución salina, el procedimiento se repitió una vez con la solución de sales inorgánicas del medio de cultivo, después de la centrifugación el aceite quedó totalmente transparente.

Los ovocitos libres de cúmulo fueron lavados dos veces transfiriendolos a gotas de medio fresco (este procedimiento se realizó en una sola caja poniendo bajo aceite la gota de hialuronidasa y dos gotas de medio de cultivo). Los ovocitos sanos deben presentar un citoplasma no granular, un cuerpo polar en el espacio perivitelino y su zona pelúcida. (Fig. - 3).

Posteriormente se despojó a los ovocitos de la zona pelúcida incubando durante un minuto en tripsina (Worthington

Biochemical Corporation) (1 mg/ml en medio). Dado que resultaba difícil extraer todos los ovocitos sin zona pelúcida -- dentro de un minuto y si permanecían más tiempo en tripsina comenzaban a dañarse, transcurrido el tiempo de incubación, se agregó a la gota más o menos una cantidad igual de inhibidor de tripsina de frijol de soya (SBTI Sigma Chemical 0.5 mg/ml) deteniendo así la acción de la tripsina sobre la membrana plasmática del ovocito (Wolf y Sokoloski, 1982). Los ovocitos desnudos (sin zona pelúcida) se lavan dos veces --- transfiriendolos a medio fresco y posteriormente se pasan a las gotas de inseminación. (Fig. 4).

La inseminación se realizó evaluando previamente la reacción acrosomal en una muestra de espermatozoides contando -- por lo menos 100 al microscopio de contraste de fase a 1000X considerando aceptable arriba de 75% de reacción acrosomal - de los espermatozoides móviles.

Se prepararon tres grupos experimentales (3 gotas de -- 100  $\mu$ l en una misma caja). A los ovocitos del grupo A (con--- trol 1) se les inseminó con una concentración suficientemente baja de espermatozoides (para que todos fueran fertilizados monospermicamente; a los ovocitos del grupo B (control - 2) se les inseminó con una concentración alta para que se -- tornaran polispermicos, a los ovocitos del grupo C (expe- rimenta) se inseminaron con baja concentración y 3 horas después se reinseminaron con alta concentración de espermatozoi

des. Los ovocitos de los grupos A y B fueron fijados y teñidos 3 horas después de la inseminación y los del grupo C a 3 horas después de la segunda inseminación, (seis horas después de la primera inseminación). (ver tabla II).

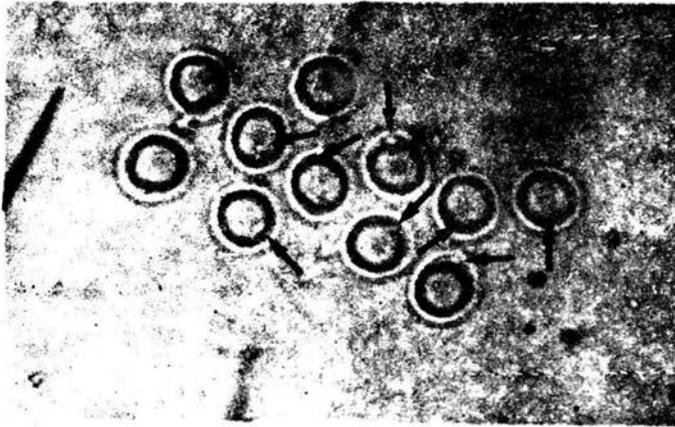


Figura 3. Fotografía a microscopio estereoscópico (125X) de ovocitos libres de células del cúmulo (no fijados ni teñidos). Observe la zona pelúcida rodeando cada ovocito y el cuerpo polar en el espacio perivitelino (flechas).



Figura 4. Fotografía a microscopio estereoscópico (125X) de ovocitos desnudos sin zona pe lúcida), la flecha señala un ovocito da ñado (no viable).

Grupo	Tratamiento
A	Inseminados con $1 \times 10^5$ espermatozoides/ml (concentración final), fijados a 3 horas.
B	Inseminados con $1 \times 10^6$ espermatozoides/ml (concentración final), fijados a 3 horas.
C	Inseminados con $1 \times 10^5$ espermatozoides/ml y reinseminados 3 horas después con $1 \times 10^6$ espermatozoides/ml para fijar 6 horas después de la primera inseminación.

Tabla II. Tratamiento que recibieron cada uno de los tres grupos experimentales.

El grupo control A nos sirvió para comprobar que a baja concentración y durante tres horas, los ovocito del grupo C fueron inseminados de manera monospermica; si en el grupo C hay menos espermatozoides por ovocito que en el grupo B, esto será una evidencia en favor de un bloqueo parcial a la polispermia a nivel de la membrana plasmática, o sea la entrada de un espermatozoide durante la primera inseminación disminuyó la posibilidad de entrada de más espermatozoides durante la segunda inseminación.

Para desechar la posibilidad de que en el grupo C entraran menos espermatozoides a los ovocitos porque estuvieran muriendo, perdiendo la capacidad de fertilizar durante el cultivo, se realizaron dos experimentos en los que la reinseminación se realizó con espermatozoides "frescos" (que solo tuvieran tres horas de incubación).

La fijación y tinción se realizó (Jaffe et al 1983) colocando los ovocitos en un portaobjetos con una gota de glutaraldehido al 1% en solución Tyrode neutralizado con CO<sub>2</sub> -- (antes de transferir los ovocitos fueron lavados dos veces para liberarlos de espermatozoides adheridos a su superficie), se colocó sobre la gota un portaobjetos con vaselina en las esquinas para que los ovocitos queden detenidos entre porta y cubreobjetos pero no aplastados; posteriormente se añade por un lado del cubreobjetos formalina al 10% en agua destilada y neutralizada a pH 7.4 con NaOH (solución usando rojo fenol como indicador, la formalina es absorbida por el

otro lado del cubreobjetos con papel absorbente (papel filtro o papel sanitario funcionaron bien). Es importante que los ovocitos nunca quedaran secos. Después se añadió orceína al 0.2% en 45% de ácido acético y se siguió absorbiendo por el otro lado. Todos estos pasos se hacen bajo el microscopio óptico a 100X para no perder los ovocitos, si estos eran llevados por la corriente, se retiraba inmediatamente el papel absorbente y se presionaban más los ovocitos bajando un poco el cubreobjetos. Cuando los ovocitos estuvieron suficientemente teñidos (aproximadamente 5 minutos) se retiró el exceso de colorante añadiendo ácido acético al 45% y absorbiéndolo por el otro lado, este paso debe quitar bien el exceso de colorante pero debe hacerse rápidamente para evitar que los ovocitos se destiñan. Se hicieron preparaciones semipermanentes sellando las orillas del cubreobjetos con barniz para -- uñas transparente. Para cada grupo se contó el número de espermatozoides que penetraron evaluando: número de pronúcleos, cabezas descondensadas y/o grupos de cromosomas. (Fig. 5).

Se aplicó la prueba de t de Student para determinar si las diferencias entre las medias de espermatozoides por ovocito de los grupos B y C son significativas.

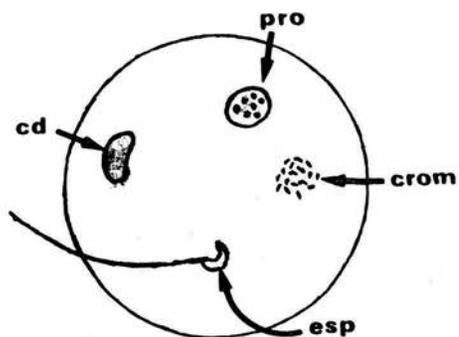


Figura 5. Esquema que ilustra el aspecto que presentan a microscopía óptica y/o contraste de fase a 400X los ovocitos fijados y teñidos con acetoorceina. Pronucleos (pro), cabeza descondensada de espermatozoide (cd), grupo de cromosomas (crom) y cabeza de espermatozoide adherida al ovocito pero que no penetró (esp).

## RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente; en cada uno de los experimentos se evaluó el número de espermatozoides por ovocito que se presentaron a microscopía óptica y/o contraste de fase a 400X, contandose: pronucleos (pro), cabezas descondensadas (cd) y grupos de cromosomas (crom); empleandose los criterios siguientes:

A) Cuando se observaba un pronucleo (pro), se establecía que éste pertenecía al ovocito y entonces se estableció que no había penetrado ningún espermatozoide; si se observaban más pronucleos, se estableció que uno es del ovocito y el resto de espermatozoides que habían penetrado. (Fig. 6).

B) Si se observaba un grupo de cromosomas (crom), se establecía que éste pertenecía al ovocito y que no había penetrado ningún espermatozoide, pero si se observaban más grupos, se establecía que uno pertenecía al ovocito y el resto a espermatozoides que penetraron. (Fig. 7).

C) En el caso de las cabezas descondensadas (cd), cuando se presentaban, cada una era evaluada como un espermatozoide penetrado. (Figs. 7 y 8).

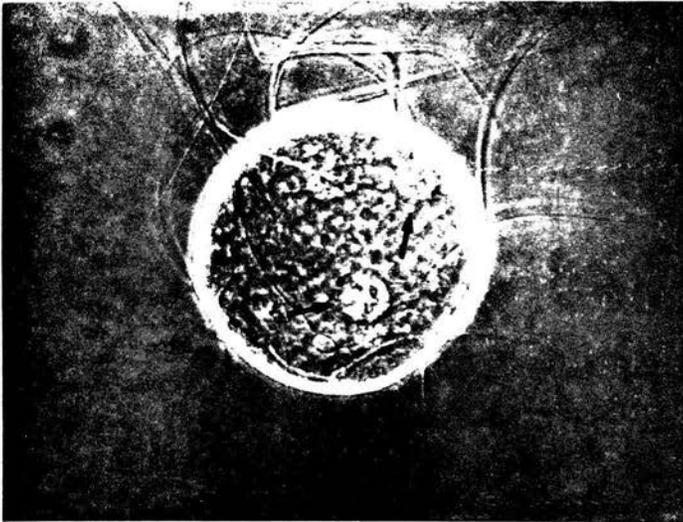


Figura 6. Ovocito fertilizado in vitro presentando dos pronucleos (flechas) fijado, teñido y observado a microscopio de contraste - de fase a 625X.

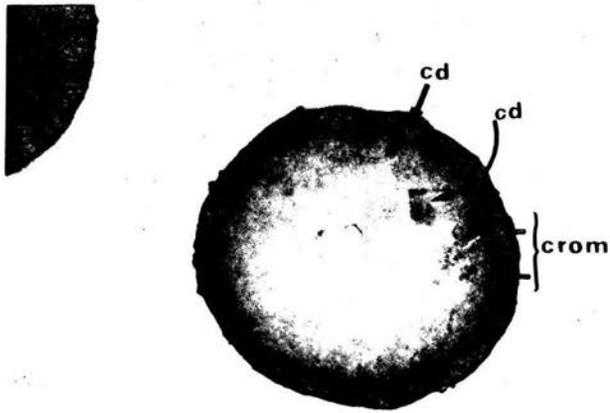


Figura 7. Fotografía de ovocito fertilizado in vitro que presenta dos grupos de cromosomas ---- (crom) y dos espermatozoides con cabeza -- descondensada (cd) fijado, teñido y observado a microscopía óptica (625X).

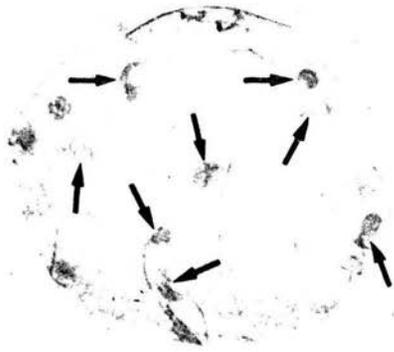


Figura 8. Ovocito fertilizado in vitro de manera polispérmica, cada mancha (flechas) -- corresponde a una cabeza descondensada fijado, teñido y fotografiado a microscopía óptica a 750X.

Por supuesto que en un solo ovocito podían presentarse combinaciones de pro, cd y crom, como por ejemplo en un ovocito se observaron: 2 pro y 4 cd y aquí se evaluaron 5 espermatozoides que penetraron; en otro se presentaron: 2 cd y 2 crom evaluandose 3 espermatozoides penetrados, etc.

La tabla III presenta los resultados de los cuatro experimentos.

La agrupación de los resultados de los cuatro experimentos se encuentra en la tabla IV. Dado que en los experimentos 3 y 4 no se observaron diferencias significativas cuando en el grupo C se reinseminó con esperma viejo o fresco (ver material y métodos), estos datos se usaron conjuntamente comprendiendo al mismo grupo.

Tabla III. Agrupación de los resultados de los cuatro experimentos.

Experi- mento y grupo	Número de ovocitos con:														No. Total de ovocitos	No. de esperma tozoides por = ovocito (x).
	1 pro	2 pro	1 crom	2 crom	3 crom	1 cd	2 cd	3 cd	4 cd	5 cd	6 cd	7 cd	8 cd	9 cd		
1 A	1	-	1	-	-	11	1	-	-	-	-	-	-	-	14	0.93
1 B	-	2	1	-	-	-	1	1	3	4	1	-	-	-	13	3.46
1 C	1	-	1	-	-	-	3	4	1	1	-	-	-	-	11	2.45
2 A	-	2	2	-	-	5	3	-	-	-	-	-	-	-	12	1.08
2 B	1	1	-	-	-	-	-	1	5	1	2	-	-	-	11	3.73
2 C	3	3	3	-	-	3	4	2	-	-	-	-	-	-	16	1.25
3 A	-	1	3	3	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	11	1.09
3 B	1	3	2	2	-	-	1	-	4	4	3	-	2	-	15	5.33
3 C	-	1	-	2	-	-	-	-	1	2	4	1	-	-	11	4.36
3 Cf*	-	1	-	1	1	-	-	1	-	2	1	2	1	1	12	5.17
4 A	2	3	1	3	-	6	2	-	-	-	-	-	-	-	15	1.07
4 B	2	-	-	2	-	-	1	-	3	4	5	4	1	-	18	5.67
4 C	4	1	1	3	-	1	3	3	5	2	3	-	-	-	20	3.40
4 Cf*	3	3	1	1	-	1	1	3	4	3	2	-	-	-	18	3.28

\* Ovocitos reinseminados con espermatozoides "frescos".

Tabla IV. Resultados totales de los cuatro experimentos.

$\bar{x}$  de espermatozoides por ovocito en cada grupo  
± D. S. (número de ovocitos).

Grupo A	Grupo B	Grupo C
1.04 ± 0.5 (52)	4.7 ± 1.8 (57)	3.2 ± 2.2 (88)
p << 0.01 (prueba de t)		

## DISCUSION

Las condiciones en que encontramos el bloqueo parcial - en la membrana plasmática difiere en mayor o menor grado de las encontradas in vivo, en cuyo caso el espermatozoide se encuentra ante otras barreras antes de entrar en contacto -- con la membrana plasmática del ovocito. Además la proporción espermatozoide/ovocito es mayor en experimentos in vitro, -- por lo que podríamos preguntar ¿qué podría significar este bloqueo en condiciones in vivo?

Podríamos pensar que este bloqueo parcial se presenta - como un mecanismo que asegura la fertilización monospermica del ovocito en el remoto caso que el bloqueo primario (a nivel de la zona pelúcida) fallara y que este bloqueo parcial funcionara únicamente cuando numerosos espermatozoides se en cuentren en el espacio perivitelino.

Aún cuando al desnudar los ovocitos, éstos fueron ex-- puestos durante muy corto tiempo (solo el mínimo suficiente para disolver la zona pelúcida) a la acción de la tripsina, - son válidas dos preguntas: ¿Hasta que punto la tripsina usada para disolver la zona pelúcida afectó la membrana plasmática?. ¿Cambió por esta razón la conformación de la membrana plasmática, cambiando también el mecanismo de interacción -- esperma-ovocito de como ocurre naturalmente?. Esta pregunta podría contestarse si se desnudaran los ovocitos mecanicamente.

Por otro lado queda la posibilidad de investigar el mecanismo por el que este bloqueo parcial se establece a nivel de la membrana plasmática descartando por supuesto algún bloqueo eléctrico (Miyasaki e Igusa, 1984).

Podemos pensar en algún mecanismo químico exclusivamente (cambio de conformación del sitio receptor del espermatozoide o cambio en la concentración de iones, etc.) o la combinación de un mecanismo químico con un mecanismo mecánico - ("endurecimiento" de la membrana plasmática provocado por el primer espermatozoide que penetra); son preguntas que quedan abiertas y por lo tanto, sujetas a estudio posterior.

El esclarecimiento de estas y muchas otras preguntas -- nos ayudará a comprender mejor el mecanismo de fertilización en hamster, en particular para poder sacar mayor provecho de la particularidad que posee el ovocito de ser penetrado por espermatozoides heterólogos incluyendo humanos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos conducen a las siguientes conclusiones:

1. Con respecto al grupo A, se observa que la gran mayoría de los ovocitos se fertilizaron monospermicamente cumpliendo su papel de grupo control; o sea podemos decir que los ovocitos del grupo C se fertilizaron monospermicamente durante la primera inseminación.

2. En los grupos C de los experimentos 3 y 4 no hubo diferencias significativas en el número de espermatozoides por ovocito entre los inseminados con espermatozoides "viejos" y "frescos" ( $p \ll 0.01$  prueba de t) (Sokal y Rohlf, 1969) por lo que se descarta la posibilidad de que en el grupo C hayan penetrado menos espermatozoides por ovocito que en el grupo B porque los espermatozoides estuvieran perdiendo su capacidad fertilizante durante el cultivo.

3. El número de espermatozoides por ovocito en el grupo C fué significativamente menor que en el grupo B ( $p \ll 0.01$  prueba de t), por lo que se establece que sí existe un bloqueo parcial a la polispermia a nivel de la membrana plasmática del ovocito de hamster.

## REFERENCIAS

1. Ausmanas, M., Turek, R.W., Blasco, L., Kopf, G.S., Ribas, J. y Mastroiani Jr, I. (1985) THE ZONA FREE HAMSTER EGG \_ PENETRATION ASSAY AS A PROGNOSTIC INDICATOR IN A HUMAN IN VITRO FERTILIZATION PROGRAM. Fertil. Steril. 43: 433-437.
2. Austin, C.R. (1951) OBSERVATIONS ON THE PENETRATION OF -- THE MAMMALIAN EGG. Aust. J. Biol. Sci. Ser B4, 581.
3. Austin, C.R. (1965) FERTILIZATION. Prentice Hall. Engle-- wood Cliff, Nueva Jersey.
4. Austin, C.R. (1982) THE EGG. En: Germ Cells and Fertiliza tion. C.R. Austin y R.V. Short eds. Cambridge University Press.
5. Austin, C.R. y Braden, A.W.H. (1965) EARLY REACTIONS OF \_ THE RODENT EGG TO SPERMATOZOON PENETRATION. J. Exp. Biol. 33: 358-365.
6. Baker, T.G. (1982) OOGENESIS AND OVULATION. En: Germ ---- Cells and Fertilization. C.R. Austin y R.V. Short eds. -- Cambridge University Press.

7. Barros, C. y Yanagimachi, R. (1972) POLYSPERMY-PREVENTING MECHANISMS IN THE GOLDEN HAMSTER EGG. J. Exp. Zool., 180: 251-256.
8. Bavister, B.D. (1981a) SUBSTITUTION OF A SYNTHETIC POLYMER FOR PROTEIN IN A MAMMALIAN GAMETE CULTURE SYSTEM. J. Exp. Zool. 217: 45-51.
9. Bavister, B.R. (1981b) ANALYSIS OF CULTURE MEDIA FOR IN VITRO FERTILIZATION AND CRITERIA FOR SUCCESS. En: Fertilization and Embryonic Development In vitro. L. Mastroiani, Jr. y J.D. Biggers eds. Plenum Press, Nueva York.
10. Bavister, B.D. (1984) COMUNICACION PERSONAL.
11. Bavister, B.D. (1985) ANIMAL IN VITRO FERTILIZATION AND EMBRYO DEVELOPMENT. En: Manipulation of Mammalian Development. Ralph Gwatkin ed. Plenum Press.
12. Bavister, B.D. y Yanagimachi, R. (1977) THE EFFECTS OF SPERM EXTRACTS AND ENERGY SOURCES ON THE MOTILITY AND ACROSOME REACTION OF THE HAMSTER SPERMATOZOA IN VITRO. Biol. Reprod. 16: 228-237.

13. Bedford, J.M. (1982) FERTILIZATION. En: Germ Cells and - Fertilization. C.R. Austin y R.V. Short eds. Cambridge - University Press.
14. Binor, Z., Sokoloski, J.E. y Wolf, D.P. (1982) SPERM INTERACTION WITH THE ZONA FREE HAMSTER EGG. J. Exp. Zool. 22: 187-193.
15. Bleil, J.D., Beall, C.F. y Wassarman, P.M. (1981) MAMMALIAN SPERM-EGG INTERACTION OF MOUSE EGG TRIGGERS MODIFICATION OF THE MAJOR ZONA PELLUCIDA GLYCOPROTEIN, ZP2. -- Dev. Biol. 86: 189-197.
16. Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1980a) STRUCTURE AND FUNCTION OF THE ZONA: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE PROTEINS OF THE OOCYTE'S ZONA PELLUCIDA. Dev. Biol. 76: 185-202.
17. Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1980b) SYNTHESIS OF ZONA PELLUCIDA PROTEINS BY DENUDED AND FOLLICULE-ENCLOSED MOUSE OOCYTES DURING CULTURE IN VITRO. Proc. Nat. Acad. --- Sci. 77: 1029- 1033.

18. Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1980c) MAMMALIAN SPERM- -  
EGG INTERACTION: IDENTIFICATION OF A GLYCOPROTEIN IN ---  
MOUSE EGG ZONAE PELLUCIDAE POSSESSING RECEPTOR ACTIVITY  
FOR SPERM. Cell 20: 873-882.
19. Chang. M.C. (1951) FERTILIZING CAPACITY OF SPERMATOZOA -  
DEPOSITED INTO THE FALLOPIAN TUBES. Nature 168: 697-698.
20. Forster, M.S., Smith, W.D., Lee, W.I., Berger, R.E., ---  
Karp, L.E. y Stenchever, M.A. (1983) SELECTION OF HUMAN  
SPERMATOZOA ACCORDING TO THEIR RELATIVE MOTILITY AND ---  
THEIR INTERACTION WITH ZONA-FREE HAMSTER EGGS. Fertil. -  
Steril. 40: 655-660.
21. Gould-Somero, M. y Jaffe, L. (1984) CONTROL OF CELL FU--  
SION AT FERTILIZATION BY MEMBRANE POTENTIAL. En: Cell -  
Fusion: Gene Transfer and Transformation. R.F. Beers Jr.  
y E.G. Basset eds. Raven Press, Nueva York.
22. Greve, J.M., Salzmann, G.S., Roller, R.J. y Wassarman, -  
P.M. (1982) BIOSYNTHESIS OF THE MAJOR ZONA PELLUCIDA GLY  
COPROTEIN SECRETED BY OOCYTES DURING MAMMALIAN OOGENESIS.  
Cell 31: 740-759.

23. Harper, M.J. (1982) SPERM AND EGG TRANSPORT. En: Germ -- Cells and Fertilization. C.R. Austin y R.V. Short eds. - Cambridge University Press.
24. Hirao, Y. y Yanagimachi, R. (1978) EFFECTS OF VARIOUS ENZYMES UN THE ABILITY OF HAMSTER EGG PLASMA MEMBRANES TO FUSE WITH SPERMATOZOA. Gam. Res. 1: 3-12.
25. Hirao, Y. y Yanagimachi, R. (1979) DEVELOPMENT OF PRONUCLEI IN POLYSPERMIC EGGS TO THE GOLDEN HAMSTER: IS THERE ANY LIMIT TO THE NUMBER OF SPERM HEADS THAT ARE CAPABLE OF DEVELOPING INTO MALE PRONUCLEI?. Zool. Mag. 88: 24-33.
26. Jaffe, L. Sharp, A.P. y Wolf, D.P. (1983) ABSENCE OF AN ELECTRICAL POLYSPERMIC BLOCK IN THE MOUSE. Dev. Biol. 96: 317-323.
27. Juetten, J. y Bavister, B.D. (1983) THE EFFECTS OF AMINO ACIDS, CUMULUS CELLS AND BOVINE SERUM ALBUMINE ON IN VITRO FERTILIZATION AND FIRST CLEAVAGE OF HAMSTER EGGS. J. Exp. Zool. 227: 487-490.
28. Lorraine, M. y Bavister, B.D. (1981) THE EFFECTS OF TAURINE AND HIPOTAUURINE ON IN VITRO FERTILIZATION IN THE -- GOLDEN HAMSTER. Gam. Res. 4: 57-63.

29. Menezes, J. y Peter, J. (1985) ROLE OF THE VITELLUS IN \_  
THE BLOCK TO POLYSPERMY IN THE GOLDEN HAMSTER EGGS. Gam.  
Res. 11: 305-309.
30. Miyasaki, S. e Igusa, Y. (1981) FERTILIZATION POTENTIAL  
GOLDEN HAMSTER EGGS CONSISTS OF RECURRING HIPERPOLARIZA-  
TIONS. Nature 290: 702-704.
31. Paul, J. (1975) CELL AND TISSUE CULTURE. Churchill Li---  
vingstone, Londres.
32. Prasad, M.R.N. (1984) THE IN VITRO SPERM PENETRATION ---  
TEST: A REVIEW. Int. J. Andr. 7: 5-22.
33. Schuel, H. (1978) SECRETORY FUNCTIONS OF EGG CORTICAL --  
GRANULES IN FERTILIZATION AND DEVELOPMENT: A CRITICAL RE  
VIEW. Gam. Res. 1: 299-382.
34. Sokal, R. y Rohlf, F. (1969) BIOMETRIA. H. Blume, Madrid.
35. Wolf, D.P. (1981) THE MAMMALIAN EGG'S BLOCK TO POLYSPER-  
MY. En: Fertilization and Embrionic Development in vitro.  
L. Mastroiani y J.D. Biggers eds. Plenum Press, Nueva --  
York.

36. Wolf, D.P. y Sokoloski, J.E. (1982) CHARACTERIZATION OF THE SPERM PENETRATION BIOASSAY. Am. Soc. Andr. 3: -----  
445-451.
37. Yanagimachi, R. (1981) MECHANISMS OF FERTILIZATION IN MAMMALS. En: Fertilization and Embrionic Development in vitro. Plenum Press, Nueva York.
38. Yanagimachi, R. (1982) IN VITRO SPERM CAPACITATION AND FERTILIZATION OF GOLDEN HAMSTER EGGS IN A CHEMICALLY DEFINED MEDIUM. En: In vitro Fertilization and Embryo ---- Transfer. E.S.E. Hafez y K. Semm eds. MTP Press, Lancaster. Reino Unido.
39. Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F. y Yanagimachi, H. (1985) MATURATION OF SPERMATOZOA IN THE EPIDIDIMIS OF THE CHINESE HAMSTER. Am. J. Ana. 172: 317-330.