

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**FUSIÓN DE MEMBRANAS EN DISTINTOS  
PROCESOS BIOLÓGICOS**

**MEMBRANE FUSION IN DIFFERENT  
BIOLOGICAL PROCESSES**

-TRABAJO DE FIN DE GRADO-

ALUMNA: BEATRIZ GONZÁLEZ MARTÍN

TUTORA: MARÍA HENAR VALDIVIESO MONTERO

Salamanca, 2018

## **ÍNDICE**

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivo</b>	<b>8</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>8</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>10</b>
<b>5. Discusión</b>	<b>24</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>27</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
NSF	Factor sensible a la N-etilmaleimida
MGC	Células gigantes multinucleadas
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ZP	Zona pelúcida
PLC $\zeta$	Fosfolipasa C zeta
IP3	Trifosfato de inositol
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
AOA	Activación ovocitaria asistida
ART	Técnicas de reproducción asistida
FIV	Fertilización in vitro

## SUMMARY

Cell fusion is fundamental for the success of several relevant biological processes in the entire biological scale. For the fusion of two cells to take place, it is essential that their plasma membranes fuse. Membrane fusion is the union of two separate lipid membranes to form a continuous bilayer. The fusion reactions require three fundamental steps: First, the contact between both membranes; Second, the formation of a hemifusion state and, finally, the opening of an aqueous fusion pore. The fusion reactions are regulated by numerous factors, highlighting the participation of certain proteins such as tetraspanins, SNAREs, or fusogens that participate in the initial recognition between membranes.

The biological processes where the fusion of membranes is very relevant include viral infection, placenta formation, and mammalian fertilization. Fertilization is the process by which two haploid gametes (sperm and oocyte) fuse to form a diploid organism. During the fertilization there are membrane fusion events in two processes: the acrosome reaction and the fusion of the spermatozoa with the oocyte. The participation of certain factors is required to guarantee that fertilization is successful; for example, inhibiting polyspermy, which is the fusion of several sperm cells to the same oocyte.

Frequently fertilization is not carried out successfully, leading to infertility. This is mainly caused by failures in the activation of the oocyte, which will prevent its nucleus from combining with that of the sperm. This failure can be caused by defects in PLC $\zeta$ , which is the protein responsible for activating the oocyte, or by abnormal oocyte maturation.

At present, assisted reproduction techniques are carried out in order to solve infertility problems. These treatments consist in artificially activating the oocyte and stimulating pregnancy by artificially approaching the sperm to the oocyte. Some of these techniques are intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or in vitro fertilization (IVF).

## INTRODUCCIÓN

### *1. Importancia de la fusión celular*

La fusión de dos o más células es una reacción universal necesaria para infinidad de procesos biológicos como la reproducción sexual (fusión óvulo-espermatozoide) y el desarrollo de células multinucleadas (fibras musculares, trofoblastos u osteoclastos).

Además, la fusión celular es esencial para la reparación de tejidos. Se ha demostrado que las células derivadas de la médula ósea se fusionan con células hepáticas, células nerviosas y células gastrointestinales y se ha planteado la teoría de que tales fusiones pueden servir para reparar células dañadas. Asimismo, mediante experimentos, se ha podido observar que la fusión celular contribuye a la progresión de enfermedades, como algunos cánceres. Esto se ha visto experimentalmente trasplantando células tumorales de origen animal o humano, que se fusionan con células normales que adquieren sus características fenotípicas. La fusión celular también es importante para la progresión de algunas infecciones víricas. En este caso, el genoma viral codifica proteínas de la envuelta que se unen a receptores de la superficie celular y ayudan al virus a entrar en la célula. Dicha célula infectada va a comenzar a sintetizar proteínas de la envuelta que, tras su inserción en el plasmalema, interacciona con proteínas receptoras en células vecinas e inicia las fusiones, de manera que estas células se infectan por el virus y se hacen resistentes a infecciones por otros virus que se unan al mismo receptor. Por otro lado la fusión de células es importante también para la homeostasis del calcio y el sistema de defensa inmune (Larsson *et al.*, 2008).

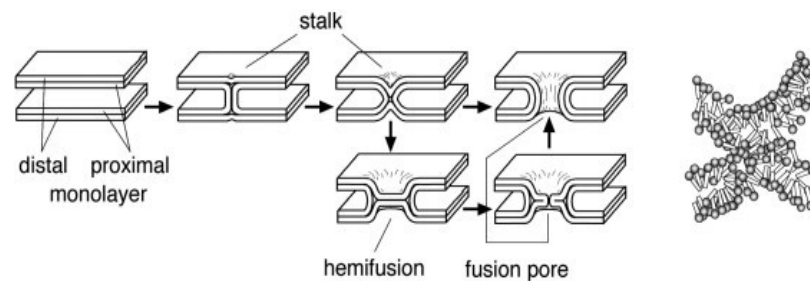
La fusión celular tiene lugar en toda la escala biológica. En procariotas este proceso es esencial para que se lleve a cabo el proceso de conjugación de manera eficiente. También forma parte del mecanismo de esporulación en algunas bacterias y de la formación de los nanotubos que conectan las bacterias individuales dentro de los biofilms. En nematodos las células somáticas se fusionan para dar lugar a diversos órganos o para dar lugar a la formación de la hipodermis como en el caso de *Caenorhabditis elegans*. En insectos, la fusión de células epidérmicas ayuda a la cicatrización de heridas. En plantas la fusión celular tiene lugar durante la doble fertilización necesaria para la formación del embrión y del endospermo, cuya función es la nutrición del embrión (Podbilewicz, 2014).

Un gran número de factores parecen regular las fusiones celulares, incluyendo moléculas de señalización, receptores y ligandos, proteasas, proteínas que organizan dominios especializados en la membrana, y proteínas fusogénicas que forman haces alfa-helicoidales que acercan las

membranas, ya que un paso fundamental para que ocurra la fusión de dos células es la fusión de sus membranas plasmáticas.

## 2. Mecanismo general de fusión de membranas

La fusión de membranas es uno de los procesos fundamentales de la vida y se produce cuando dos membranas lipídicas separadas se mezclan para formar una bicapa continua (Jahn *et al.*, 2003). Este proceso se puede llevar a cabo entre células, entre diferentes compartimentos intracelulares o entre compartimentos intracelulares y la membrana plasmática (Martens y McMahon, 2008). A pesar de la diversidad en su composición, todas las reacciones de fusión ocurren mediante un mecanismo que incluye el contacto entre las membranas, la formación de un estado de hemifusión y la apertura de un poro de fusión acuoso. El modelo actualmente vigente para la fusión de las membranas lipídicas es el denominado “*stalkmodel*” o “modelo del tallo” (Figura 1).



**Figura 1. Estados de transición en la fusión de membranas.** A la izquierda, se representa las monocapas que son láminas lisas y flexibles. En el centro el estado de hemifusión, y a la derecha la apertura del poro. (Referencia??)

Este modelo nos indica que el proceso de fusión ocurre en dos etapas. En primer lugar, se debe llevar a cabo la aproximación entre las dos bicapas que van a fusionarse y para ello se necesitan vencer las fuerzas electrostáticas repulsivas generadas entre las cabezas polares de los lípidos. En segundo lugar, el límite entre la parte hidrófila e hidrófoba de la bicapa se desestabiliza haciendo que una pequeña área de las monocapas proximales se curve produciendo una estructura en forma de tallo o “*stalk*”; seguidamente se forma el estado de hemifusión (estado en el que se produce mezcla de las monocapas proximales pero no de las más distales), que permite la apertura de un pequeño poro acuoso (de unos 2 nm) que comunica los compartimentos delimitados por las membranas que van a fusionarse, y que debe expandirse para completar la fusión de las membranas. La formación del poro de fusión se lleva a cabo en microsegundos y en los siguientes 10-20 milisegundos se habrá expandido totalmente. En el modelo de hemifusión el poro de fusión es lipídico, pero existe una hipótesis alternativa en la que se

postula que el poro está formado por proteínas transmembrana, aunque queda por establecer si estas proteínas participan directamente en los estados de transición o indirectamente, interactuando con proteínas de fusión tales como las SNARES (Jahn *et al.*, 2003).

La expansión de los poros de fusión en las últimas etapas de los procesos de fusión de membranas se debe a la tensión mecánica. Sin embargo, todavía no se sabe por qué algunos procesos de fusión dan como resultado la expansión de poros de fusión que unifican completamente dos volúmenes cerrados con membrana, mientras que otros procesos de fusión son abortados antes de su terminación (Kozlov y Chernomordik, 2015).

Debido al gran gasto energético que conlleva la formación de los estados intermediarios en la fusión de membranas, generalmente la fusión no ocurre espontáneamente en membranas lipídicas libres de proteínas. Las funciones de las proteínas en este proceso son: aproximar las dos membranas, generar curvatura y remodelar la membrana y/o regular la composición de lípidos y proteínas. Aunque el estado de hemifusión parece estar conservado, no sucede lo mismo con las proteínas que intervienen en la fusión, de manera que pueden ser de naturaleza muy diferente y no estar relacionadas estructuralmente (Martens y McMahon, 2008).

### 3. *Proteínas que intervienen en la fusión de membranas*

Las reacciones de fusión son catalizadas por diversas proteínas, las cuales participan en el reconocimiento inicial de las membranas que van a participar en el proceso de fusión y tiran de dichas membranas para romper la interfase lípido-agua e iniciar la mezcla de los lípidos; esto puede ser realizado o bien por una única proteína o por complejos de proteínas que son necesarios para garantizar una regulación estricta en el espacio y en el tiempo (Jahn *et al.*, 2003). Se denomina “fusógeno” a aquellas proteínas necesarias para que se produzca la fusión de membranas que intervienen directamente en este proceso. Tras su activación sufren un cambio conformacional que deja expuesto el péptido de fusión, el cual interacciona con la membrana provocando la desestabilización de la misma y la fusión (Aguilar *et al.*, 2013).

En el proceso de fusión de vesículas en el transporte intracelular, que es de los procesos de fusión de membranas más caracterizados, se requiere de tres componentes básicos: 1) Rab-GTPasas, que son necesarias para organizar el sitio de fusión; 2) proteínas SNARE, que son los fusógenos que actúan durante la fusión, 3) la ATPasa N-etilmaleimida-factor sensible (NSF) en colaboración con su cofactor  $\alpha$ -SNAP, los cuales son necesarios para el reciclaje o la activación de los receptores de SNAP (SNARE). (Ungermann y Langosch, 2005).

Hay varios tipos de SNARE, y todos ellos se caracterizan por ser proteínas ancladas a la membrana por un único dominio transmembrana. Los v-SNARE están anclados a la membrana de la vesícula de transporte intracelular. Entre ellos está la synaptobrevina o VAMP2. Los t-

SNARE están anclados a la membrana diana o “target” donde se va a fusionar la vesícula. Entre ellos están la syntaxina y SNAP-25. El complejo trans-SNARE se forma por la interacción de tres t-SNARE y un v-SNARE, que forman un ramillete de cuatro hélices paralelas. El modelo para explicar cómo los SNARE facilitan la fusión celular se denomina “modelo en cremallera”. En este modelo, se propone que la fusión de membranas se induce por un proceso de trenzado que acerca las membranas de la vesícula y el orgánulo diana la membrana. La energía que se libera al entrelazarse los SNARE y alcanzar un estado de equilibrio es suficiente para sobrepasar la barrera energética de la repulsión de las bicapas lipídicas. Por ello los SNAREs juegan un papel central en la fusión de membranas en la célula, y en particular en la exocitosis de las vesículas sinápticas en las terminaciones nerviosas, mediando la fusión de las vesículas con la membrana plasmática para la liberación de neurotransmisores en la transmisión sináptica (Fang y Lindau, 2014).

Otro grupo importante de proteínas que intervienen o que tienen relación con la fusión de membranas son las tetraspaninas. Se denominan así porque tienen cuatro dominios transmembrana. No se conoce muy bien su papel en la fusión ya que carecen de actividad enzimática pero tienen una gran facilidad para interactuar con otras proteínas o lípidos por lo que se cree que regulan la actividad de las moléculas fusogénicas (proteínas que intervienen directamente en la fusión de membranas). De interés es su participación en la aparición de extensas interdigitaciones en las membranas plasmáticas durante la fusión de monocitos. Estas estructuras pueden promover el agrupamiento de moléculas fusogénicas en regiones específicas de la membrana plasmática, facilitando así la fusión de las membranas. Ejemplos de esto son los vínculos establecidos entre microvellosidades y tetraspaninas en la fusión de óvulo-espermatozoide y en la fusión virus-célula inducida por virus.

Podemos encontrar varios tipos de tetraspaninas que van a participar en diferentes procesos, aunque la que más relevancia tiene es la CD9 ya que interactúa con otras moléculas en diversos procesos. Esta tetraspanina es necesaria para la fusión del óvulo y el espermatozoide, ya que va a controlar la curvatura de la membrana y va a regular el acceso de la maquinaria de fusión a las áreas de contacto de célula-célula. Se ha observado que este tipo de proteínas también tiene un papel relevante en la fusión del mioblasto, ya que experimentalmente se ha demostrado que la adición de anticuerpos monoclonales que reconocen las tetraspaninas CD9 y CD81 a un cultivo retrasan la fusión de mioblastos y promueven la degeneración temprana de los miotubos, estructuras principales del músculo esquelético. CD9 y CD81 tienen relevancia también en la formación de MGC (células gigantes multinucleadas) que están asociadas con procesos inflamatorios crónicos (Fanaeil *et al.*, 2011).



Por otra parte, los lípidos actúan como reguladores y facilitadores de la fusión de membranas. Además de modificar las propiedades físicas de la membrana, influyen en la conformación óptima de proteínas con actividad catalítica. Entre las moléculas lipídicas que intervienen en la fusión de membranas ya sea de manera directa o indirecta, tenemos la fosfatidiletanolamina que incrementa la curvatura negativa en las membranas y por lo tanto facilitará la fusión celular. Por otro lado, las fosfolipasas pueden metabolizar los fosfolípidos en lisofosfolípidos, los cuales van a intervenir en procesos de señalización y también van a poder inhibir la formación del estado de hemifusión cuando están presentes en la hemimembrana externa, incrementando la curvatura positiva de la misma (Chernomordik y Kozlov, 2008).

#### 4. *Procesos biológicos donde la fusión de membranas es muy relevante*

- **Infección por virus:** la infección por virus con envuelta ocurre por la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula diana. Esto ocurre gracias a la presencia en la superficie del virus de muchas “proteínas de fusión” que se encuentran en una conformación de prefusión. Se forma un estado de transición conformacional fusogénica debido a la unión de un ligando, que puede ser un correceptor, un protón o una proteína distinta en la superficie del virión. La fusión de estas dos membranas es un proceso favorable termodinámicamente, pero con una barrera cinética muy alta. Las proteínas de fusión reducen esa barrera cinética mediante el uso de la energía libre liberada durante un cambio conformacional de las proteínas. La fusión de la bicapa se realiza mediante un estado de hemifusión, en el que se fusionan monocapas adyacentes y la posterior formación de poros de fusión (Harrison, 2015).
- **Formación de la placenta:** Después de la fecundación el embrión empieza a dividirse y pocos días después se va a formar el blastocisto, el cual está compuesto por el trofoectodermo y el embrioblasto. El blastocisto es una estructura fundamental para que pueda tener lugar la implantación. El trofoectodermo experimenta una fusión intercelular generando sincitios primitivos, los cuales promueven la implantación del embrión en el endometrio materno. En la segunda semana de embarazo aparecen las vellosidades que contienen los citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos. Para que tenga lugar la implantación, el sincitiotrofoblasto va a ir digiriendo el endometrio mediante enzimas proteolíticas y va a proliferar rápidamente entre el tejido endometrial hasta alcanzar el interior de la mucosa uterina. A lo largo del embarazo humano, los sincitios se mantienen mediante la fusión continua de citotrofoblastos con los sincitiotrofoblastos superpuestos, en un proceso regenerativo. Estos sincitios en contacto con la sangre materna controlan todos los

intercambios de gases y nutrientes entre el feto y la madre, y producen y secretan hormonas específicas del embarazo (Gerbaud y Pidoux, 2014).

- **Formación del músculo:** el proceso de fusión se caracteriza por la alineación de membranas de mioblastos y miotubos y reordenamientos del citoesqueleto de actina en los sitios de contacto seguido de fusión de membrana, que se produce en dos etapas: a partir de la fusión de los mioblastos, o bien con otros mioblastos para generar miotubos multinucleados durante la miogénesis (a esto se le conoce como fusión primaria), o bien con otros miotubos durante el proceso de crecimiento y regeneración muscular (fusión secundaria). La fusión de mioblastos en mamíferos está regulada por varias proteínas de adhesión celular (subunidades  $\alpha 3$ -,  $\alpha 9$ - y  $\beta$ -integrina, neogenina, M- y N-cadherina, CD36 y una desintegrina), lípidos transmembrana (colesterol y fosfatidilserina) y proteínas de señalización ( $\beta$ -catenina, kindlin-2, mioferina o creatina quinasa B); además requiere de calcio extracelular y de cambios en la morfología de la membrana celular y en la organización del citoesqueleto. La fusión de células miogénicas se requiere para facilitar el crecimiento del músculo durante el desarrollo y la reparación de las miofibras después de la lesión (Demonbreun *et al.*, 2015).
- **Tráfico intracelular:** el tráfico vesicular consiste en el transporte de lípidos y proteínas entre dos compartimentos membranosos de las células en vesículas rodeadas por membrana. El tráfico vesicular engloba procesos de endocitosis (entrada de macromoléculas a la célula), y de exocitosis o secreción (tráfico desde el interior a la superficie celular). En los procesos de tráfico intracelular, la membrana del organelo donador se invagina rodeando a las proteínas cargo hasta formar las vesículas que se liberan y se transportan hasta el organelo aceptor. Una vez allí se fusionan a su membrana, en un proceso mediado por los SNARES que van a impulsar la fusión y se van a unir a la ATPasa que es la encargada de proporcionar la energía para la fusión. Por otro lado se necesita también GTPasas Rab activadas con GTP, que actúan principalmente mediando la formación de un enlace entre las membranas opuestas para establecer el contacto inicial entre las vesículas del orgánulo donador y el aceptor y su órgano aceptor antes de la participación de SNARE (Kümmel y Ungermann, 2014).

La exocitosis es la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática. Estas vesículas expulsan su contenido al espacio extracelular. La exocitosis puede ser:

- **Regulada:** se lleva a cabo en células especializadas, endocrinas o exocrinas. Su fusión con la membrana se produce por un aumento en la concentración de calcio, ATP y GTP. Una

parte de estas vesículas reguladas se fusionan con la membrana para salir al exterior (digestión) y otra parte se mantiene en reserva (ayudan a la fisiología de otras células).

- Constitutiva: la llevan a cabo todas las células. En este caso las vesículas se producen continuamente y van desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática, se fusionan con ella y liberan su contenido al exterior. También pueden trasladar moléculas desde las vesículas para regenerar a la propia membrana plasmática (Südhof y Rizo, 2011).

- **Fertilización en mamíferos**: La fertilización o fecundación es un proceso por el cual dos gametos haploides se fusionan para dar lugar a un cigoto diploide, a partir del cual se generará un individuo cuya dotación genética será una combinación de la de los padres. Este proceso es muy parecido en todas las especies, aunque con algunas variaciones debidas a las diferentes estructuras que poseen los gametos. Para que las membranas plasmáticas de ambos gametos se fusionen, y la fecundación tenga éxito, tienen que tener lugar una serie de procesos que se van a desarrollar en profundidad a lo largo de este trabajo. (Rubinstein *et al.*, 2006).

## **OBJETIVO**

El objetivo de este trabajo es revisar la bibliografía existente acerca de los distintos aspectos que intervienen la fusión de la membrana plasmática del óvulo y del espermatozoide durante el proceso de fertilización en mamíferos. Se presta una atención particular a aquellos aspectos que son críticos para el proceso, y cuya alteración va asociada a casos de infertilidad en humanos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Este trabajo es bibliográfico, por lo que se ha realizado una revisión sistemática de documentos científicos dedicados a la fusión de membranas en los distintos procesos biológicos. También se han consultado revisiones y estudios científicos sobre el tema a tratar, prestándose más atención a la fusión de membranas en la fertilización de mamíferos.

Inicialmente se ha obtenido información en la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), por ser ésta una de las herramientas más potentes a la hora de buscar información ya que posee infinidad de artículos científicos; además de desarrollar un sistema de búsqueda (Pubmed) que nos permite acceder a bases de datos bibliográficos abarcando gran cantidad de campos. Por este motivo se ha tomado Pubmed como sistema de búsqueda principal para buscar la información con la que se ha realizado este trabajo.

La búsqueda se inició utilizando la palabra clave “membrane”, pero de esta manera se obtuvieron una cantidad excesiva de artículos, que abarcaban de forma general gran cantidad de

información no útil para el trabajo. Por este motivo, se buscó “membrane fusion”, y en este caso de la gran cantidad de artículos disponibles se extrajeron aquellos que mostraban revisiones acerca del proceso; es decir, que definía en qué consistía dicho proceso, cómo se lleva a cabo y lo relacionaba con otros fenómenos biológicos como por ejemplo la tensión mecánica. Leyendo los artículos obtenidos en esta búsqueda, se pudo observar la especial relevancia de ciertas proteínas en el proceso, por lo que se amplió la búsqueda para obtener más información acerca de ellas. Principalmente se buscaron artículos relacionados con las tetrapaninas y con los SNAREs ya que eran de las que menos información había obtenido anteriormente. Una vez obtenida toda la información necesaria para poder explicar de manera general el proceso de fusión de membranas, se optó por averiguar el papel que tenía la fusión de membranas en procesos biológicos esenciales, como infección por virus, formación de la placenta, formación de músculo, tráfico intracelular y fertilización en mamíferos (tema que se ha desarrollado más a fondo en el trabajo). Para ello se usaron como términos de búsqueda general: “cell-cell fusion” y de manera más específica: “viral membrane fusion”, “membrane fusion in muscle”, “human trophoblast fusion” y “The endosomal-lysosomal system”. Con todos los artículos obtenidos de dichas búsquedas se obtuvo la información común a todos ellos e información que no aparecía en todos, pero que parecía relevante para el trabajo.

Posteriormente, y dado que uno de los puntos más desarrollados en el trabajo trata de la fertilización en mamíferos, se obtuvo información más específica sobre este tema en concreto. Para ello se introdujeron en Pubmed los términos de búsqueda: “Cell–cell membrane fusion during mammalian fertilization” y “sperm–oocyte fusion”. Por último quiero destacar que aunque la mayor parte del trabajo se ha desarrollado a partir de la información obtenida en artículos y revisiones científicas, también se han consultado libros, que han aportado información complementaria.

## **RESULTADOS**

### **FERTILIZACIÓN EN MAMÍFEROS**

Como se ha mencionado, la fertilización o fecundación es un proceso por el cual dos gametos haploides se fusionan para dar lugar a un organismo diploide. Este organismo será capaz de originar nuevos individuos cuya dotación genética será una mezcla de los padres.

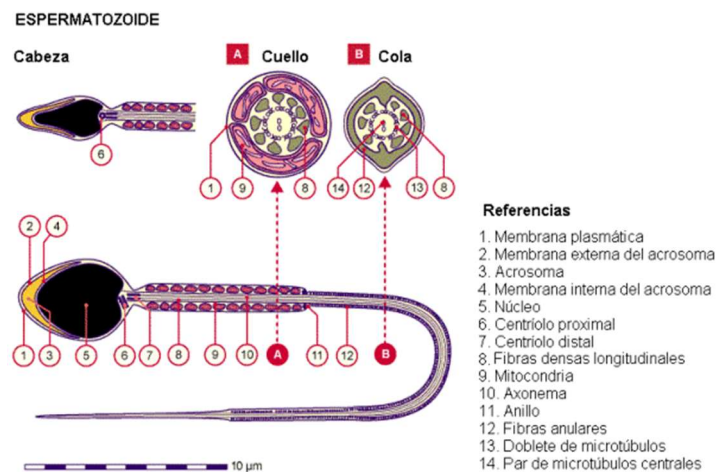
Este proceso es muy parecido en todas las especies, aunque con variaciones. Estas variaciones son debidas a las diferentes estructuras que poseen los gametos; pero el proceso en sí es común.

En el caso de los mamíferos esta fecundación es interna y se caracteriza porque los espermatozoides se encuentran y reconocen con los ovocitos en las trompas de Falopio. A lo

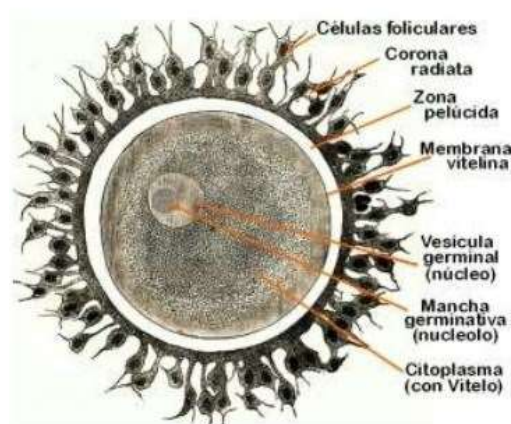
largo del trayecto que recorren, los espermatozoides van adquiriendo movilidad y cambiando la composición de las moléculas que llevan asociadas a la membrana plasmática. Este proceso se denomina capacitación y es necesario para el reconocimiento espermatozoide-ovocito (Alberts *et al.*, 2002).

### 1. Fusión espermatozoide-ovocito

En este punto del trabajo se resume el proceso de interacción entre los dos gametos, que conduce a la fusión de sus membranas, y por lo tanto a la fertilización. Para explicar cómo se lleva a cabo la fusión entre el espermatozoide y el ovocito es necesario hacer referencia a algunas estructuras de dichos gametos. Para facilitar la comprensión del proceso se muestran a continuación la estructura del espermatozoide (Figura 2) y del ovocito (Figura 3). A su vez, la Figura 4 muestra un esquema de cómo ocurre la interacción entre los dos gametos.



**Figura 2. Estructuras del espermatozoide** (Biología celular y humana, Viviana E. Sabbatino)



**Figura 3. Estructuras del ovocito** (Biología celular y humana, Viviana E. Sabbatino)

Los gametos femeninos y masculinos van a permanecer separados hasta el momento antes de la fusión. A lo largo del trayecto que recorren los espermatozoides, éstos van adquiriendo movilidad y cambiando la fluidez de su membrana plasmática, así como la composición de las moléculas que son integrantes o van asociadas a dicha membrana. Este proceso se denomina capacitación y es necesario para el reconocimiento espermatozoide-ovocito.

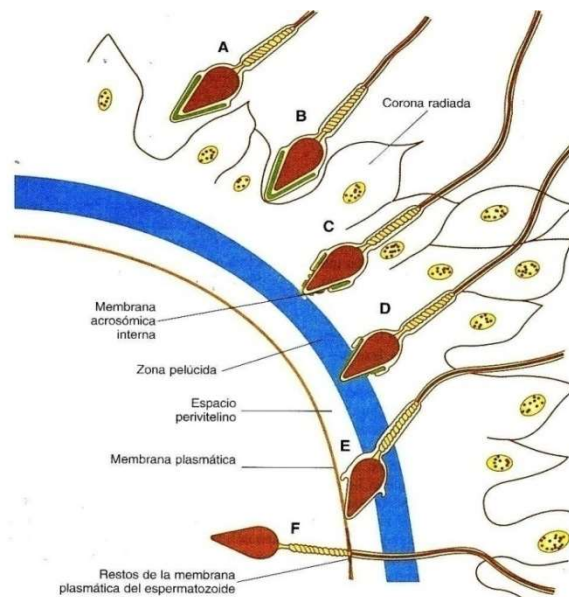
Para que se lleve a cabo la fusión de las membranas plasmáticas, el espermatozoide tiene que alcanzar el complejo cúmulo-ovocito (complejo formado por el ovocito y las células foliculares que le sustentan). Una vez allí atraviesa las capas celulares y se va a unir a las capas extracelulares del ovocito. Las dos capas externas que rodean al ovocito son la corona radiata y la zona pelúcida (ZP).

La unión del espermatozoide a la ZP desencadena la denominada reacción del acrosoma espermático. El acrosoma es un organelo, situado en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide (Figura 2) que está formado por una acumulación de vesículas de secreción que contienen enzimas hidrolíticas, principalmente hialuronidasa. Durante la reacción del acrosoma estas vesículas de secreción se fusionan en varios puntos con la membrana plasmática, creándose poros a través de los cuales las enzimas hidrolíticas del acrosoma salen hacia el ovocito. Gracias a la liberación y la acción de estas enzimas, el espermatozoide puede penetrar en la ZP. La reacción del acrosoma modifica la membrana plasmática del espermatozoide debido a la incorporación a su membrana plasmática del material de membrana procedente de la región interna de la membrana del acrosoma espermático, provocando la reubicación de ciertas proteínas de membrana en otras regiones de membrana; estas alteraciones de la membrana plasmática son necesarias para la fusión.

Una vez atravesada la ZP, el espermatozoide entra en la zona que hay entre ésta y la membrana plasmática del ovocito (oolema), el llamado espacio perivitelino. Una vez allí, el espermatozoide se une al oolema. La membrana plasmática del ovocito está recubierta por microvellosidades a excepción de la región donde se encuentra el huso mitótico, denominada región amicrovilar, en la cual nunca se va a llevar a cabo la fusión. Al igual que ocurre en el óvulo, el espermatozoide tiene restringida la región de su membrana plasmática que participa en la fusión celular. Las regiones excluidas de la fusión inicial son la membrana acrosomal interna recién incorporada y la membrana plasmática de la cola, de modo que la membrana plasmática que interviene en la fusión es la región ecuatorial (Rubinstein *et al.*, 2006).

Más tarde, la región posterior de la cabeza y la cola del espermatozoide serán incorporadas por el óvulo a través de la fusión de sus membranas. La región anterior de la cabeza será fagocitada por el huevo de manera que el núcleo, que contiene el material genético, también pasa al interior

y se fusiona con el del ovocito. Una vez fusionados, se activa el metabolismo para formar nuevas estructuras (membranas, organelos...) (Rubinstein *et al.*, 2006; Primakoffa y Mylesb, 2007).



#### **Figura 4. Fusión espermatozoide-ovocito.**

Penetración de la corona radiada (A y B). Reacción acrosómica (C). Anclaje a la zona pelúcida (D). Finalmente integración de las membranas del ovocito y el espermatozoide (E) y entrada al ovocito (F). REFERENCIA??

Normalmente sólo un espermatozoide será capaz de atravesar las capas externas del ovocito, alcanzando su membrana plasmática y fusionándose con ella, dando como resultado la formación de un cigoto. La unión de más de un espermatozoide al mismo óvulo se denomina polispermia. La polispermia es un fenómeno perjudicial, que podría conducir a la aparición de organismos con dotaciones genéticas aberrantes. La reacción acrosómica, que facilita la fusión, ayuda prevenir la polispermia. Una vez en el espacio perivitelino, el espermatozoide se une a la región microvilar del oolema, produciéndose la fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos, por lo que nos queda prácticamente una sola célula. En el momento en el que se fusiona el primer espermatozoide, se va a producir un cambio en la diferencia de potencial de la membrana del ovocito (Kaji y Kudo, 2004). Esto inhibe la polispermia de una forma rápida ya que, si hubiera más de un espermatozoide unido a la membrana del gameto femenino, este cambio en el potencial haría que se separasen. Pero en estas condiciones, podría haber un nuevo intento de fusión. Por ello hay una segunda inhibición de la polispermia, en este caso lenta, en la

que se produce la liberación del contenido de los gránulos corticales hacia la ZP. Los gránulos corticales son organelos que se localizan en la membrana de los ovocitos no fertilizados y que liberan su contenido modificando la configuración de la ZP. De esta manera ya no se pueden unir más espermatozoides porque ya no se pueden acoplar (Paniagua, 1983; Liu, 2011).

En resumen, hay una serie de factores necesarios para que la fusión de las membranas de los dos gametos tenga éxito. A lo largo de los siguientes puntos del trabajo se van a desarrollar distintos aspectos que afectan al éxito de la fertilización.

## 2. *Moléculas involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito*

### **En ovocitos:**

- **CD9:** es una proteína de la familia de las tetraspaninas que se encuentra en toda la superficie del ovocito, excepto en la región que recubre el huso mitótico. La CD9 forma parte de una variedad de complejos multiproteicos implicados en diversos procesos celulares y fisiológicos.

La primera indicación de que CD9 es funcional en la fertilización se obtuvo a partir de experimentos usando un anticuerpo contra CD9 (Chen *et al.*, 1999). En este estudio, encontraron que el anticuerpo contra CD9 inhibió la unión espermatozoide-ovocito.

En experimentos posteriores (Kaji y Kudo, 2004), se observó que los ratones hembra con deficiencia de CD9 eran estériles y que sus ovocitos rara vez se fusionaban con los espermatozoides in vivo o in vitro. CD9 puede cooperar con otras moléculas para facilitar la fusión del espermatozoide con el ovocito. El éxito de las fecundaciones in vitro se debe al mayor tiempo de incubación, el cual permitirá que se lleven a cabo un mayor número de fusiones exitosas. Y también se debe a la formación de complejos multiproteicos en la membrana plasmática por parte de las tetraspaninas.

- **CD81:** es una tetraspanina que se asemeja mucho a la CD9 en cuanto a su estructura y a su función. Se encuentra en la superficie del ovocito y en numerosas ocasiones interactúa con CD9 en la fusión célula-célula, por lo que se la ha propuesto para desempeñar un papel en la fusión. La delección del gen CD81 da como resultado una reducción menos drástica de la fertilidad que la delección de CD9. También hay pruebas de un papel extracelular de CD81, pero esto aún está en estudio (Klinovska *et al.*, 2014).
- **Proteínas con anclaje GPI:** las proteínas con anclaje GPI poseen un resto de fosfatidilinositol glicosilado unido covalentemente que sirve para unir la porción de proteína de la molécula a la bicapa lipídica de la superficie celular. En un estudio en el que se trató al ovocito con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, se vio que esto provocaba la liberación de dos proteínas con anclaje GPI, y que había un fuerte bloqueo en la fusión entre el



espermatozoide y el ovocito (Kaji y Kudo, 2004). Se propuso que las proteínas ancladas GPI específicas de ovocitos participaban en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito.

En un segundo estudio se generaron ratones que carecían de la enzima PIG-A (codifica la primera enzima en la vía biosintética del anclaje GPI) y resultaron ser infértiles, mientras que las hembras que sí tenían esta enzima eran fértiles. Después del apareamiento se encontraron muchos espermatozoides en el espacio perivitelino de estos ovocitos sin PIG-A, demostrándose que la infertilidad se debía a un fallo en la unión o fusión de la membrana plasmática ya que las interacciones entre el espermatozoide y el ovocito ocurrían de forma correcta (Primakoff y Myles, 2007).

### **En espermatozoides:**

- **DE:** también conocido como CRISP - 1 y AEG - 1. Se localiza en la región dorsal del espermatozoide y posteriormente migra hacia los segmentos ecuatoriales, donde el espermatozoide comienza a fundirse con un ovocito (Kaji y Kudo, 2004).

Hasta ahora se desconoce cómo se asocia la proteína DE con la membrana plasmática del espermatozoide. DE tiene un papel muy importante en la fusión de los óvulos con el espermatozoide. Esto se observó mediante la inhibición de dicha fusión por parte de un anticuerpo policlonal contra DE, que impedía la fusión sin modificar la movilidad del espermatozoide. Además se ha observado que la proteína DE purificada parece unirse a toda la superficie de los ovocitos, excepto la región sobre el huso meiótico, donde raramente se fusiona el espermatozoide, lo que sugiere que hay un receptor para DE en la superficie de los oocitos para promover la fusión espermatozoide-ovocito (Rubinstein *et al.*, 2006).

- **Izumo:** la proteína Izumo se identificó por primera vez por la capacidad del anticuerpo monoclonal anti-Izumo (OBF13) para inhibir la fusión de espermatozoide-óvulo *in vitro*. Se descubrió que la expresión de izumo era específica de los testículos y su localización no se limita sólo al segmento ecuatorial de los espermatozoides. El gen Izumo codifica una nueva superfamilia de inmunoglobulinas, IgSF (Rubinstein *et al.*, 2006).

En experimentos con ratones machos se observó que los que portaban una delección para del gen izumo eran estériles, pero había un comportamiento normal en la movilidad de los espermatozoides, la reacción del acrosoma y la migración al oviducto. Además se encontraron espermatozoides con izumo en el espacio perivitelino de los ovocitos lo que indica un defecto de fusión, no de migración; esto se confirmó por ensayos de fertilización *in vitro* ya que ningún óvulo podía ser fertilizado con espermatozoides sin izumo (Primakoff y Myles, 2007).

### 3. Activación del ovocito

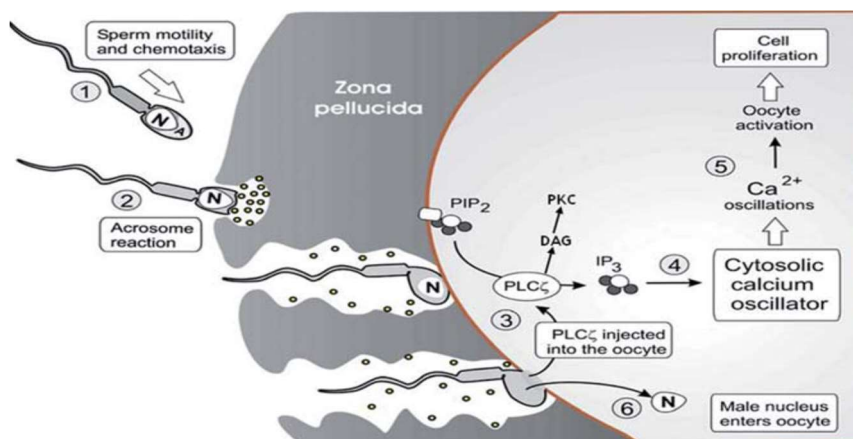
La activación de los ovocitos consiste en una serie de procesos, desencadenados por la entrada del espermatozoide, en los que los ovocitos detenidos en la metafase II serán convertidos en óvulos fecundados. El ovocito se tiene que liberar de la detención de la metafase II para que finalice el ciclo celular y se forme el pronúcleo haploide femenino. Este núcleo femenino se combinará con el núcleo del espermatozoide para generar un cigoto, cuyo crecimiento estará apoyado por reorganizaciones del citoesqueleto (Kashir *et al.*, 2010).

Después de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito, se produce un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio proveniente de las reservas del retículo endoplasmático (Wakai y Fissore, 2013). Estos aumentos de calcio serán los responsables de los primeros eventos de la activación de ovocitos y de los cambios citológicos que tendrán lugar en los ovocitos fertilizados. La disminución de las concentraciones de calcio se llevará a cabo una vez que se hayan formado los pronúcleos (Day *et al.*, 2000; Jones, 2005).

Las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del ovocito de mamífero son un resultado directo de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). Estas oscilaciones de calcio son desencadenadas por la fosfolipasa C zeta (PLC $\zeta$ ). La PLC $\zeta$  es una proteína activadora de ovocitos que es liberada por el espermatozoide al citosol del ovocito (Saunders *et al.*, 2002).

En el mecanismo de señalización de PLC $\zeta$  lo que ocurre en primer lugar es que el espermatozoide va a atravesar la zona pelúcida del ovocito, como ya se ha visto anteriormente, hasta llegar al citosol del ovocito. Allí PLC $\zeta$  hidroliza almacenes fosfatidilinositolbisfosfato internos en diacilglicerol e IP<sub>3</sub>. Después el IP<sub>3</sub> se une a su receptor en el retículo endoplasmático, produciendo oscilaciones de calcio que se liberarán en el citosol del ovocito.

Finalmente esta liberación de calcio supondrá la activación del ovocito (Figura 5) (Kashir *et al.*, 2010).



**Figura 5. Señalización de PLCz** (Berridge, 2009).

Es posible que fallos en las funciones o la isoforma de PLC $\zeta$  presentes en las células sean las causantes de la infertilidad masculina y del fallo en la activación de los ovocitos (Meerschaut *et al.*, 2014).

Para que la fertilización tenga éxito se necesita que la maduración del ovocito ocurra correctamente. Tanto la maduración citoplasmática como nuclear son pasos cruciales para que los ovocitos adquieran la capacidad de responder adecuadamente a la señal de PLC $\zeta$  en el momento de la fecundación. La capacidad de generar oscilaciones de calcio requiere varios cambios intracelulares: reorganización del retículo endoplasmático, aumento del número de receptores IP3, cambios en las propiedades bioquímicas de los receptores (sensibilidad a IP3), aumento de la concentración de iones calcio almacenados en retículo endoplasmático y redistribución de proteínas del retículo de unión al calcio (Ajduk *et al.*, 2008; Goud *et al.*, 1999; Goud *et al.*, 2002; Vanderheyden *et al.*, 2009). Los estudios sobre ovocitos no fertilizados en los ciclos de FIV / ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides) han revelado la presencia de microtúbulos de huso mitótico y de interfase anormales, lo que indica que las deficiencias en los componentes ooplasmáticos y nucleares pueden ser una causa de fertilización fallida (Ramadan *et al.*, 2012).

### 3.1 Fallo en la activación del ovocito

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es, actualmente, la técnica más eficiente para superar la infertilidad masculina. La ICSI se lleva a cabo cuando los espermatozoides tienen dificultades para penetrar en el ovocito por sí solos, por lo que con esta técnica se escoge el mejor espermatozoide y se introduce en el interior del citoplasma del óvulo, de manera directa, mediante una aguja de microinyección.

Hay que tener en cuenta que hay un porcentaje muy marcado de fallos en la fertilización durante los ciclos del ICSI. Cuando se produce un fracaso en la fecundación ICSI, hay que averiguar si el fallo está relacionado con el espermatozoide o con el ovocito. Es de vital importancia saber de dónde proviene el fallo en la activación de los ovocitos para informar al paciente de la posible transmisión a sus descendientes y para encontrar tratamientos adecuados al problema.

Se considera que la deficiencia en la activación de ovocitos es la causa principal de fracaso en la fertilización después del ICSI, aunque también debe considerarse la detención pronuclear de los cigotos humanos. Este último hecho se produce por fallos en la meiosis del ovocito MII humano o por un desorden espermático del centrosoma que llevarán a la oposición de los pronúcleos (núcleo de los gametos) necesarios para la singamia (fecundación) (Kashir *et al.*, 2010).

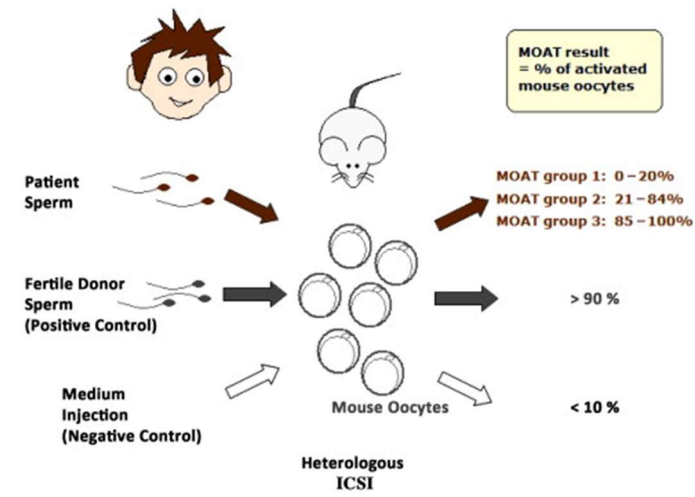
Una vez que los pacientes experimentan un fallo completo en la fertilización, o un éxito muy bajo de fertilización muy baja después del ICSI, se les ofrece la prueba de MOAT (prueba de activación de ovocitos del ratón). MOAT es un modelo heterólogo a ICSI y que se utilizó por primera vez para el diagnóstico de activación de ovocitos de ratón, para examinar la capacidad de activación del espermatozoide en un paciente infértil por inyección en ovocitos de ratón (Rybouchkin *et al.*, 1996). MOAT va a comparar, después de la ICSI, el porcentaje de ovocitos de ratón activados utilizando espermatozoides del paciente frente a espermatozoides de control positivo (con capacidad de activación probada). La inyección con medio de cultivo sirve como el control negativo (figura 6). MOAT clasifica a estos pacientes en tres grupos atendiendo al porcentaje de activación de ovocitos de ratón:

- 1) Grupo de baja activación (20%): el fracaso se debe a un fallo en el espermatozoide.
- 2) Grupo de activación intermedia (21% - 84%): capacidad de activación reducida de los espermatozoides en los pacientes, por lo que el resultado es inconcluso.
- 3) Grupo de alta activación (85% o más): la deficiencia en los pacientes del grupo 1 es refutada en este caso.

Por lo tanto este experimento determina si las deficiencias en los ovocitos ya estaban presentes antes de la ICSI.

Para mejorar el diagnóstico y pronóstico de la información de este modelo, este grupo de estudio incorporó el análisis de la oscilación del patrón de calcio. El análisis del patrón oscilatorio del calcio confirmó el resultado MOAT en los grupos 1 y 3, en el caso del grupo 2 no se observaron patrones oscilatorios de calcio fuertemente diferentes, con una amplitud y frecuencia significativamente inferiores en comparación con los espermatozoides de control (Heindryckx *et al.*, 2008).

Posteriormente Vanden Meerschaut *et al.* (2013) demostraron que el análisis del patrón de calcio era interesante para atribuir a los pacientes del grupo 2 una deficiencia de activación relacionada con el espermatozoide u ovocitos.



**Figura 6. Vista resumida de MOAT** (Meerschaut, Nikiforaki, Heindryckx y De Sutter, 2014).

Hay que aclarar que los resultados de MOAT y el estudio de defectos asociados a PLC $\zeta$  no pueden extrapolarse estrictamente a ovocitos humanos, ya que la potencia de PLC $\zeta$  humana es mayor que la de PLC $\zeta$  de ratón, lo que significa que una capacidad de activación ligeramente reducida en el espermatozoides humano, revelado por MOAT, podría causar el fallo total de fertilización en los ovocitos humanos. Por lo tanto, el MOAT puede no ser lo suficientemente sensible como para revelar deficiencias de activación en todas las muestras de espermatozoides, por lo que se requieren pruebas diagnósticas más precisas para determinar la capacidad de activación ( Meerschaut *et al.*, 2014).

### 3.2 Implicación de PLC $\zeta$ en el fallo de activación de ovocitos

Dado el papel propuesto de PLC $\zeta$  en la activación de ovocitos, es posible que las anomalías en esta enzima puedan ser la causa de infertilidad masculina en algunos casos, y del fallo en la activación de ovocitos. Como se ha comentado en el apartado anterior, se ha demostrado que los espermatozoides de los hombres infértiles, que fracasan la ICSI, no pueden producir oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> al inyectarse en ovocitos de ratón, o producen oscilaciones con amplitud y frecuencia reducida en relación a las oscilaciones que presentan los hombres fértiles; la capacidad de activación de dichos espermatozoides se puede recuperar mediante inyección con ARNm de PLC $\zeta$  de ratón. Además, ensayos de inmunofluorescencia y el análisis de inmunotransferencia han revelado que los pacientes infértiles, cuyo espermatozoides falló en ICSI y no fueron capaces de producir oscilaciones de Ca<sup>2+</sup>, mostraron anomalías en la expresión de la fosfolipasa. En los estudios que revelaron los hechos anteriores se

utilizaron individuos que presentaban globozoospermia (espermatozoides de cabeza redonda que carece de acrosoma) y en ellos se detectaron niveles reducidos o ausencia de expresión de PLC $\zeta$ . La utilización de espermatozoides globozoospermicos daba lugar a tasas de fertilización altas después del uso de ICSI junto con un ionóforo Ca $^{2+}$ . Numerosos estudios han sugerido que la globozoospermia es un síndrome genético que está relacionado con la presencia de una mutación en el gen SPATA16, aunque el modo de herencia todavía no está muy claro (Kashir *et al.*, 2010).

Heytens *et al.* (2009) identificaron una mutación de sustitución heterocigótica en la secuencia codificante de PLC $\zeta$  en un varón infértil no globozoospermico dentro del dominio Y en la posición 398 que causa la sustitución de una histidina (H398) por prolina. Los alineamientos de secuencias múltiples confirmaron que la histidina se conservaba en esta posición está conservada en la fosfolipasa z de mamíferos, indicando que este residuo puede jugar un papel importante dentro de la proteína. Es posible que la mutación H398P pudiera causar cambios importantes en la función de PLC $\zeta$ , ya que la prolina es un aminoácido no polar con un grupo lateral voluminoso y que estabiliza la proteína. Dicha mutación podría perturbar una estructura de hélice alfa en la región catalítica y afectar las interacciones con aminoácidos vecinos.

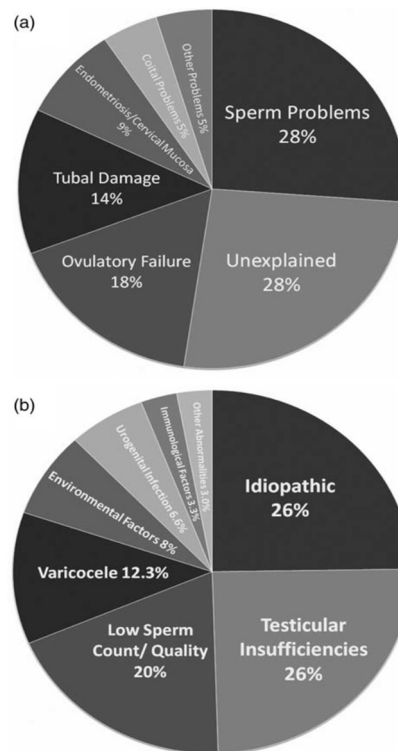
#### 4. Infertilidad

##### 4.1 ¿Por qué se produce?

La infertilidad consiste en la incapacidad para que se produzca un embarazo después de un tiempo razonable en el que dos individuos de diferente sexo mantienen relaciones sexuales sin tomar medidas anticonceptivas. La infertilidad afecta a ambos géneros de maneras muy diferentes, por eso cuando los estudios se centran en cuatro factores de la pareja infértil:

- 1) Factor ovulatorio
- 2) Factor tubárico peritoneal
- 3) Factor de migración del semen
- 4) Factor masculino

La infertilidad se puede deber a numerosas causas como podemos observar en la siguiente gráfica:



**Figura 7: (a) Principales causas de la infertilidad (b) Principales causas de infertilidad masculina.** AQUÍ LA REFERENCIA QUE HAY QUE PONER ES DE LA QUE TÚ HAS SACADO LA FIGURA (Hull *et al.*, 1985; Maheshwari *et al.*, 2008 y Wilkes *et al.*, 2009) (Dohle *et al.*, 2009)

Durante los últimos veinte años se han producido tres cambios importantes relacionados con la infertilidad:

- 1) Ha habido cambios sociales que han hecho que aumente la proporción de mujeres mayores de 35 años que buscan el embarazo.
- 2) El desarrollo de la biología molecular y de la genética, que se ha convertido en una metodología muy importante para el estudio, diagnóstico y evaluación de las parejas, muchas de ellas consideradas hasta ahora como "parejas infértiles inexplicables" (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001).
- 3) La introducción de tecnologías de reproducción asistida para el estudio de procesos reproductivos básicos.

#### 4.2 Activación artificial de ovocitos en humanos

Para superar el fallo en la activación de los ovocitos, las clínicas de reproducción asistida humana llevan a cabo la activación artificial de los ovocitos a pesar de que esto no se logra con facilidad; esta activación artificial también sirve para la creación de embriones

partenogénéticos (Paffoni *et al.*, 2008) e involucran la transferencia nuclear de células somáticas (Campbell *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo esto, utilizan una serie de métodos entre los que se incluyen los estímulos físicos, químicos o mecánicos, los cuales producirán un aumento de calcio en el citoplasma de ovocitos. En cuanto a los estímulos físicos destaca el impulso eléctrico. Este impulso provoca que las proteínas cargadas que se encuentran en la bicapa lipídica de la membrana plasmática se muevan manera que se formen poros a través de los cuales se producirán movimientos de calcio, provocando un aumento de su concentración en el ovocito y activando éste; una vez que se produce la activación la concentración de calcio disminuye y vuelve a sus valores normales (Egashira *et al.*, 2009; Yanagida *et al.*, 2008).

La activación ovocitaria asistida (AOA) mecánica puede lograrse interrumpiendo la membrana plasmática y realizando una aspiración citoplasmática firme durante un procedimiento ICSI modificado (Ebner *et al.*, 2004; Tesarik *et al.*, 2002). Ésta aspiración puede aumentar la carga de calcio del ovocito en el momento de la inyección y así conducir a una mayor tasa de fertilización. Además, puede establecer un contacto más cercano de la cabeza de espermia inyectada con reservas intracelulares de calcio del ovocito (Tesarik y Sousa, 1995).

Los agentes activadores artificiales más populares para los ovocitos humanos incluyen ionóforos de calcio, tales como ionomicina y A23187 (calcimicina) (Nasr-Esfahani *et al.*, 2010; Yanagida *et al.*, 2008). Los ionóforos de calcio son moléculas liposolubles sintetizadas por microorganismos que transporta calcio a través de la bicapa lipídica aumentando la permeabilidad de dicho ion y provocando la activación del ovocito.

Otro agente activador químico artificial que se ha descrito en el tratamiento de reproducción asistida humana es el cloruro de estroncio que en combinación con oscilaciones de calcio causa la activación de ovocitos, como se ha demostrado en ratones. Éste tratamiento es muy eficiente tanto en la partenogénesis de ratón como en la transferencia nuclear de células somáticas, pero en el caso de la activación de ovocitos en humanos todavía está en discusión debido a que no observamos oscilaciones de calcio (Kyono *et al.*, 2008; Yanagida *et al.*, 2006). Zhang y colaboradores demostraron que las oscilaciones del calcio inducidas por el cloruro de estroncio estaban mediadas a través del receptor IP3 y requerían la activación de la PLC $\zeta$  y la acción sinérgica de IP3 (Zhang *et al.*, 2005). Se piensa que el cloruro de estroncio se mueve dentro del oocito a lo largo del gradiente de concentración, provocando que el calcio se libere del retículo endoplásmico.



## 5. Técnicas de reproducción asistida

Las técnicas de reproducción asistida (ART) consisten en una serie de tratamientos destinados a resolver los problemas de infertilidad en la pareja. Consisten en técnicas mediante las cuales se trata de aproximar de forma artificial a los ovocitos con los espermatozoides con el objetivo de favorecer el embarazo.

La aplicación de estos tratamientos requiere la colaboración estrecha de profesionales con formación clínica como ginecólogos, urólogos y andrólogos. También requiere de especialistas en técnicas de laboratorio destinadas a evaluación y tratamiento de espermatozoides, ovocitos y embriones; y además de todo lo anterior, personal de apoyo como psicólogos y personal de enfermería. La presencia de psicólogos en estas clínicas es muy importante ya que desear tener un hijo y no poder alcanzar ese deseo es fuente de estrés, angustia y, en algunos casos, depresión.

Los tratamientos clínicos y los procesos de laboratorio se desarrollan escogiendo entre varias modalidades la más adecuada para cada caso.

Las ART se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Técnicas dirigidas a favorecer que la unión del espermatozoide con el ovocito se lleve a cabo en las trompas de Falopio:
  - **Coito programado:** consiste en una estimulación de la ovulación y controles ecográficos periódicos que tienen el objetivo de conocer el número de folículos presentes en los ovarios y de programar el momento adecuado para tener relaciones sexuales.
  - **Inseminación intrauterina:** para ello es necesario la estimulación de la ovulación para lograr el desarrollo de varios folículos. Cuando los folículos alcancen el tamaño deseado, se le aplica una inyección para favorecer la maduración final y la ovulación. Después, mediante una cánula, se deposita espermatozoides en la cavidad uterina.
- Técnicas dirigidas a favorecer la unión entre el ovocito y el espermatozoide en el laboratorio, lo que implica la necesidad de extraer los óvulos del organismo de la mujer.
  - **Fertilización in vitro (FIV):** la fertilización del óvulo por el espermatozoide se produce en el laboratorio, pero el proceso de fertilización es totalmente natural. Para ello se colocan un promedio de 50000 espermatozoides alrededor del óvulo, que es penetrado naturalmente por uno de ellos. Así se forman los embriones, que se mantienen en cultivo en el laboratorio entre 2 y 5 días y luego son transferidos a la cavidad uterina por medio de un delgado catéter, mediante un procedimiento sencillo.

- **Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)**: consiste en la inyección de un único espermatozoide en el interior del óvulo. Para realizar esto se efectúa un procedimiento idéntico al que se describió previamente para la FIV con una única diferencia en la etapa de fertilización: en vez de incubar los espermatozoides con el óvulo, éste es inyectado para colocar un espermatozoide en su interior. Esta técnica ha abierto una importante posibilidad terapéutica, especialmente para la esterilidad conyugal de origen masculino.

Las condiciones en que se realizan actualmente las técnicas de reproducción asistida y los exhaustivos controles que se efectúan han reducido las complicaciones. Aún así, las técnicas de reproducción asistida pueden tener consecuencias no deseables. Dichas consecuencias pueden provocar complicaciones durante la estimulación ovárica y la inseminación artificial dando lugar a la gestación múltiple, síndrome de hiperestimulación ovárica, infecciones genitales severas o intolerancias a la medicación. También pueden surgir complicaciones en la fecundación in vitro con las mismas consecuencias que en los casos anteriores (Pérez Milán *et al.*, 2012).

## **DISCUSIÓN**

Una característica muy importante de la membrana celular es su capacidad de fusionarse con otras membranas para dar lugar a una bicapa lipídica nueva, hecho esencial para que se lleven a cabo muchos procesos biológicos, como son la reparación de tejidos o la progresión en enfermedades (Larsson *et al.*, 2008). La fusión de membranas es un proceso que se lleva a cabo a lo largo de toda la escala biológica y que ocurre mediante el contacto entre membranas, y la formación de un poro de fusión (Jahn *et al.*, 2003). Aunque la tensión es un candidato más que aceptable para impulsar la expansión de los poros de fusión en las últimas etapas de la fusión de membrana, todavía se está a la espera de una mejor comprensión de su papel real. Otra opción es que sean algunas proteínas las que generen la apertura del poro, o al menos que participen en el proceso (Kozlov y Chernomordik, 2015).

Las funciones de las proteínas que intervienen en la fusión son fundamentalmente aproximar las dos membranas, generar curvatura y remodelar la membrana y/o regular la composición de lípidos y proteínas (Martens y McMahon, 2008). Sin embargo, no se puede descartar la participación directa de algunas proteínas en la apertura del poro de fusión. Estas funciones son realizadas principalmente por los fusógenos y las SNAREs (Ungermann y Langosch, 2005), ya que aunque la presencia de las tetraspaninas en este proceso es marcada, todavía no se conoce con exactitud su función. Sin embargo, las moléculas de acoplamiento específicas utilizadas

para lograr la asociación estable entre las dos membranas no se han identificado en ningún evento de fusión célula-célula, como formación de miotubos o como la fertilización (Fanaeil *et al.*, 2011).

Los avances en el conocimiento de los procesos de fusión célula-célula se han beneficiado de los avances en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares de la fusión de membranas. Debido a la limitación de los materiales y a las dificultades en el análisis de las interacciones proteína-proteína de la membrana, el mecanismo molecular de la fusión espermatozoide-ovocito aún no se ha dilucidado, aunque es uno de los eventos más importantes ya que desencadena el inicio del desarrollo y es esencial para la conservación de las especies. La fusión es un componente crítico de la reproducción sexual, consistente en pasos coordinados que culminan en la fusión de membranas plasmáticas que permite la posterior convergencia de los citoplasmas y la fusión nuclear. Los pasos previos que culminan en la fusión celular incluyen interacciones de gametos, específicamente adhesión celular (Rubinstein *et al.*, 2006).

Un paso crítico en la fusión de los gametos es la activación del ovocito. Está claro que PLC $\zeta$  desempeña un papel fundamental en la activación de los ovocitos de mamíferos. La modificación genética, molecular o bioquímica de esta proteína clave está fuertemente relacionada con el fallo en la activación de los ovocitos y en la infertilidad masculina (Meerschaut *et al.*, 2014). Para superar el fallo en la activación de los ovocitos, las clínicas de reproducción asistida humana llevan a cabo la activación artificial de los ovocitos con una serie de diversos tratamientos destinados a resolver los problemas de infertilidad en la pareja (Campbell *et al.*, 2005).

A pesar de la riqueza de información respecto al tema que podemos encontrar, hay ciertos aspectos que todavía no están muy claros y en los que habrá que investigar más para resolver todas las dudas. Además las investigaciones desarrolladas hasta el momento abren muchos interrogantes que dan pie a que se siga investigando en el futuro. A partir de la información existente y los resultados obtenidos hasta el momento (Fanaeil *et al.*, 2011; Meerschaut *et al.*, 2014; Kozlov y Chernomordik, 2015) queda claro que algunos de los aspectos a investigar serían:

- 1) Caracterizar la función de las tetraspaninas durante la fusión de las membranas, ya que ésta todavía no se conoce con claridad debido a que carecen de actividad enzimática. Con la información obtenida hasta ahora se cree que regulan la actividad de las moléculas fusogénicas gracias a su facilidad para interactuar con lípidos y otras proteínas.
- 2) Conocer cómo actúa la tensión mecánica en la expansión de los poros generados durante la fusión de membranas. Habría que contestar a la pregunta ¿Por qué en algunos casos la

expansión de poros une dos espacios cerrados con membrana y en otros casos esto se impide antes de su terminación?

- 3) Estudiar en más detalle el papel de PLC $\zeta$ . Está claro que PLC $\zeta$  desempeña un papel fundamental en la activación de los ovocitos de mamíferos y que las modificaciones de esta proteína están relacionados con la infertilidad. Éste entendimiento actual se basa en el estudio de un número limitado de casos por lo que todavía faltan datos clínicos relacionados con PLC $\zeta$  que habría que estudiar.
- 4) Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la unión y fusión espermatozoide-ovocito. A pesar de ser uno de los eventos más importantes, el mecanismo molecular de la fusión espermatozoide-ovocito no se ha aclarado debido a dificultades en el análisis de las interacciones proteína-proteína de la membrana. Mediante otros estudios y el análisis de la interacción entre estas moléculas, se podrían aclarar los mecanismos moleculares implicados en la fusión.
- 5) Identificar las moléculas implicadas en la fusión de las bicapas lipídicas. Las moléculas de acoplamiento específicas utilizadas para lograr la asociación estable entre las dos membranas no se han identificado en ningún evento de fusión célula-célula, por lo que convendría ahondar más en el tema.
- 6) Avanzar en la puesta a punto de nuevas y más eficientes técnicas de reproducción asistida. Las clínicas de reproducción asistida han ayudado en los problemas de fertilidad mediante diversos tratamientos; sin embargo, todavía suele haber fallos en su aplicación. Para ello, debe haber una aplicación práctica de los nuevos conocimientos teóricos que se vayan descubriendo. Así, es probable que PLC $\zeta$  proporcione a la clínica ART mejoras significativas en el pronóstico y las pruebas diagnósticas, y opciones más seguras para la intervención terapéutica.

## CONCLUSIONES

- 1) La fusión de membranas, la cual participa en numerosos procesos biológicos, se produce cuando dos membranas lipídicas separadas se mezclan para formar una bicapa continua.
- 2) La reacción de fusión se lleva a cabo mediante tres pasos: contacto entre membranas, formación de un estado de hemifusión y la apertura de un poro de fusión.
- 3) Durante la fertilización hay fusión de membranas en dos procesos: la reacción del acrosoma y la fusión del espermatozoide con el ovocito.
- 4) Hay una serie de factores, como la inhibición de la polispermia, que van a actuar permitiendo que la fertilización tenga éxito.
- 5) Fallos en la activación del ovocito, fallos en las funciones o en la isoforma de la PLC $\zeta$  o maduración incorrecta del ovocito provocarán que la fertilización no se lleva a cabo con éxito lo que dará lugar problemas de infertilidad en el individuo.
- 6) Para solucionar los problemas de infertilidad se llevan a cabo tratamientos que consisten en activar de manera artificial el ovocito y de favorecer el embarazo acercando de manera artificial el espermatozoide al ovocito.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adjuk, A., Malagocki, A., y Maleszewski, M. (2008). Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced  $Ca^{2+}$  oscillations. *Reprod. Biol.*, 8, pages 3–22.
- Aguilar et al. (2013). Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet.*, 29, pages 427-437.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., 2002, *Molecular biology of the cell*, New York, Garland Science.
- Berridge MJ. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signaling mechanisms. *Biochim Biophys acta*, pages 933-940.
- Brugo-Olmedo S, Chillik C y Kopelman S. (2001). Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online.*, 2, pages 41-53.
- Campbell, K.H., Alberio, R., Choi, I., Fisher, P., Kelly, R.D., Lee, J.H., y Maalouf, W. (2005). Cloning: eight years after Dolly. *Reprod. Domest. Anim.*, 40, pages 256–268.
- Chernomordik LV y Kozlov MM. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.*, 15, pages 675-683.
- Chen H y Sampson NS. (1999). Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilinbeta. *Chemistry and Biology*, 6, pages 1–10.
- Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, Takahashi Y, Bigler D, Chang A, Yamashita Y, Kincade PW, Herr JC y White JM. (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *PNAS*, 96, pages 11830–11835.
- Day, M.L., McGuinness, O.M., Berridge, M.J., y Johnson, M.H. (2000). Regulation of fertilization-induced  $Ca^{2+}$  spiking in the mouse zygote. *Cell Calcium*, 28, pages 47–54.
- Alexis R. Demonbreun, Bridget H. Biersmith y Elizabeth M. McNally. (2015). Membrane fusion in muscle development and repair. *Semin Cell Dev Biol.*, 45, pages 48-56.
- Dohle GR, Jungwirth A, Kopa Z, Giwercman A, Diemer T. y Hargreave TB. (2009). Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology*.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Jesacher, K. y Tews, G. (2004). Complete oocyte activation failure after ICSI can be overcome by a modified injection technique. *Hum. Reprod.*, 19, pages 1837–1841.
- Egashira, A., Murakami, M., Haigo, K., Horiuchi, T. y Kuramoto, T. (2009). A successful pregnancy and live birth after intracytoplasmic sperm injection with globozoospermic sperm and electrical oocyte activation. *Fertil. Steril.*, 92.
- Marzieh Fanaei1, Peter N. Monk y Lynda J. Partridge. (2011). The role of tetraspanins in fusion. *Biochemical Society Transactions*, volume 39, part 2, pages 524-528.
- Qinghua Fang y Manfred Lindau. (2014). How could SNARE proteins open a fusion pore? *Physiology*, 29, pages 278-285.
- P. Gerbaud y G. Pidoux. (2014). Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta*, 36, pages 35-42.
- Goud, P.T., Goud, A.P., Van Oostveldt, P., y Dhont, M. (1999). Presence and dynamic redistribution of type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in human oocytes and embryos during in-vitro maturation, fertilization and early cleavage divisions. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, pages 441–451.
- Goud, P.T., Goud, A.P., Leybaert, L., Van Oostveldt, P., Mikoshiba, K., Diamond, M.P., y Dhont, M. (2002). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function in human oocytes: calcium responses and oocyte activation-

related phenomena induced by photolytic release of InsP3 are blocked by a specific antibody to the type I receptor. *Mol. Hum. Reprod.*, 8, pages 912–918.

- Stephen C. Harrison. (2015). Viral membrane fusion. *Virology*, 479-480, pages 498-507.
- Heindryckx, B., De Gheselle, S., Gerris, J., Dhont, M. y De Sutter, P. (2008). Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Biomed. Online*, 17, pages 662–668.
- Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S.Y., Fissore, R.A., Hamer, R., Deane, C.M., Ruas, M., Grasa, P., Soleimani, R., Cuvelier, C.A., Gerris, J., Dhont, M., Deforce, D., Leybaert, L., y De Sutter, P. (2009). Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.*, 24, pages 2417–2428.
- Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DL, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM y Desai KM.(1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J*, 291, pages 1693-1697.
- Reinhard Jahn, Thorsten Lang y Thomas C. Südhof. (2003). Membrane Fusion. *Cell*, Volume 112, Issue 4, pages 519-533.
- Jones, K.T. (2005). Mammalian egg activation: from Ca<sup>2+</sup> spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130, pages 813–823.
- Keisuke Kaji y Akira Kudo. (2004). The mechanism of sperm–oocyte fusion in mammals. *Reproduction*, 124, pages 423-429.
- J. Kashir, B. Heindryckx, C. Jones, P.De Sutter, J. Parrington, y K. Coward. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Human Reproduction Update*, 16, pages 690-703.
- Karolina Klinovska, Natasa Sebkova y Katerina Dvorakova-Hortova. (2014). Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, pages 10652-10668.
- Michael M Kozlov y Leonid V Chernomordik. (2015). Membrane tension and membrane fusión. *Current Opinion in Structural Biology*, 33, pages 61-67.
- Daniel Kümmel y Christian Ungermann. (2014). Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis.
- Kyono, K., Kumagai, S., Nishinaka, C., Nakajo, Y., Uto, H., Toya, M., Sugawara, J. y Araki, Y. (2008). Birth and follow-up of babies born following ICSI using SrCl2 oocyte activation. *Reprod. Biomed. Online*, 17, pages 53–58.
- Lars-Inge Larsson, Bolette Bjerregaard y Jan Fredrik Talts. (2008). Cell fusions in mammals. *Histochem Cell Biol.*, 129, pages 551–561.
- Min liu. (2011). The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Liu Reproductive Biology and Endocrinology*, 9.
- Maheshwari A, Hamilton M y Bhattacharya S. (2008). Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Hum Reprod*, 23, pages 538–542.
- Martens y McMahon. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9, pages 543-556.
- Nasr-Esfahani, M.H., Deemeh, M.R. y Tavalae, M. (2010). Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril*, 94, pages 520–526.

- Paffoni A., Brevini, T.A., Gandolfi, F., y Ragni, G. (2008). Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta*, 29, pages 121–125.
- Paniagua Gomez-Alvarez, R, Nistal Martín de Serrano, M, 1983, *Introducción a la histología animal comparada: Atlas-libro de la estructura microscópica de los animales*, Labor editorial.
- Podbilewicz B. (2014). Virus and cell fusion mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 30, pages, 111-139.
- Paul Primakoffa y Diana G. Mylesb. (2007). Cell–cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS Letters*, 581, pages 2174-2180.
- Walaa M Ramadan, Junaid Kashir, Celine Jones y Kevin Coward. (2012). Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Ramadan et al. Cell Communication and Signaling*, 10, pages 1-20.
- Eric Rubinstein, Ahmed Ziyat, Jean-Philippe Wolf, François Le Naour y Claude Boucheix. (2006). The molecular players of sperm–egg fusion in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17, pages 254-263.
- Rybouchkin, A., Dozortsev, D., Pelinck, M.J., De Sutter, P. y Dhont, M. (1996). Analysis of the oocyte activation capacity and chromosomal complement of roundheaded human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 11, pages 2170–2175.
- Sabbatino Viviana E., *Biología celular y humana*.
- Saber más sobre fertilidad y reproducción asistida. (2012). *Sociedad Española de fertilidad*.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., y Lai, F.A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca (2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129, pages 3533–3544.
- Thomas C. Südhof y Josep Rizo. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3.
- Tesarik, J. y Sousa, M. (1995). Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca<sup>2+</sup> fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil. Steril.*
- Tesarik, J., Rienzi, L., Ubaldi, F., Mendoza, C. y Greco, E. (2002). Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome spermborne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil. Steril.*, 78, pages 619–624.
- Christian Ungermann y Dieter Langosch. (2005). Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *Journal of Cell Science*, 118, pages 3819-3828.
- Vanden Meerschaut, F., Leybaert, L., Nikiforaki, D., Qian, C., Heindryckx, B. y De Sutter, P. (2013). Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure. *Hum. Reprod.*, 28, pages 87–98.
- Frauke Vanden Meerschaut, Dimitra Nikiforaki, Björn Heindryckx y Petra De Sutter. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reproductive biomedicine online*, 28, pages 560-571.
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., De Roo, C., Lierman, S., Qian, C., Schmitt-John, T., De Sutter, P., y Heindryckx, B. (2013). Comparison of pre and post implantation development following the application of three artificial activating stimuli in a mouse model with round-headed sperm cells deficient for oocyte activation. *Hum. Reprod.*, 28, pages 1190–1198.



- Vanderheyden, V., Wakai, T., Bultynck, G., De Smedt, H., Parys, J.B., y Fissore, R.A. (2009). Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 function during oocyte maturation by MPM-2 phosphorylation. *Cell Calcium*, 46, pages 56–64.
- Wakai, T. y Fissore, R.A. (2013). Ca(2+) homeostasis and regulation of ER Ca(2+) in mammalian oocytes/eggs. *Cell Calcium*, 53, pages 63–67.
- Wilkes S, Chinn DJ, Murdoch A y Rubin G. (2009). Epidemiology and management of infertility: a population-based study in UK primary care. *Fam Pract*, 26, pages 269–274.
- Yanagida, K., Morozumi, K., Katayose, H., Hayashi, S. y Sato, A. (2006). Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod. Biomed. Online*, 13, pages 801–806.
- Yanagida, K., Fujikura, Y., and Katayose, H. (2008). The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology. *Reprod. Med. Biol.*, 7, pages 133–142.
- Zhang, D., Pan, L., Yang, L.H., He, X.K., Huang, X.Y., y Sun, F.Z. (2005). Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Hum. Reprod.*, 20, pages 3053–3061.