

## Influència de les cobertes occitàries en la fecundació

per Jordi López

Els mamífers Euteris —que són aquells que disposen de vertader úter i que per tant no inclouen ni els monotremes ni els marsupials— han desenvolupat al llarg de l'evolució un oòcit amb una coberta molt gruixuda. Aquest fet ha condicionat decisivament l'evolució dels espermatozoides tot modificant les seves propietats.

Jordi López Camps (Barcelona 1950). Obtingué l'any 1979 el doctorat en Biològiques. Treballa al Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona, del qual és subdirector.

### Introducció

La necessitat de realitzar la fecundació *in vitro* ha estat l'estímul que durant els darrers anys ha animat la majoria d'estudis sobre els fenòmens que regulen la biologia de la reproducció. Gràcies a aquests estudis ha estat possible de conèixer els principals successos que es donen abans de la fecundació i quins són els mecanismes que la controlen. La majoria d'estudis han estat fonamentalment realitzats en Mamífers Euteris, tant per les facilitats que aquests animals presentaven per realitzar treballs experimentals com per la similitud que els fenòmens observats tenien amb la reproducció humana. Els únics grups d'invertebrats a on s'ha treballat experimentalment han estat els equinoderms, profusament, i molt minoritàriament en alguns mol·luscs. En pocs anys, els estudis sobre la fecundació s'han diversificat enormement i han donat peu a múltiples i variats camps de recerca, estudis especialitzats sobre: maduració, capacitació, reacció acrosòmica, fecundació *in vitro*, fusió de membranes, descondensació nuclear, etc...

Des d'una perspectiva més àmplia, situant-nos en el terreny dels estudis comparatius, la Biologia de la Reproducció apareix com un fenomen en contínua diversificació i complexitat. La majoria de fenòmens descrits en els Mamífers Euteris són totalment inèdits en altres grups d'animals. Quan la fecundació esdevé interna hi ha un canvi important en l'estratègia

reproductiva de les espècies. L'existència d'un ambient estable que proporciona protecció per a la realització de la fusió dels gàmetes i el desenvolupament dels estadis embrionaris determina canvis importants en els paràmetres reproductius. La fecundació interna permet reduir la producció de gàmetes, més espectacularment en la línia germinal femenina; originar nous mecanismes de trobament dels gàmetes i determinar l'aparició d'unes cobertes al voltant dels oòcits que, a més de complir un paper protector per als primers estadis embrionaris, esdevé una barrera important que els espermatozoides han de superar per dur a terme la fecundació.

Els Mamífers Euteris han desenvolupat una coberta oocitària desproporcionada, extraordinàriament gruixuda, la zona pel·lúcida, i, a diferència de la resta de vertebrats, externament els gàmetes estan envoltats per cèl·lules de la capa granulosa (el *cumulus oophorus/corona radiata*). Per què els mamífers euteris necessiten unes cobertes tant gruixudes al voltant dels oòcits? Encara avui no es disposa de cap resposta a aquesta qüestió. Però el que sembla més que probable és que aquestes cobertes han condicionat l'evolució estructural i fisiològica dels espermatozoides dels Euteris i han determinat l'aparició d'una sèrie de fenòmens de transformació i modificació de les propietats dels espermatozoides testiculars. Part d'aquestes adaptacions es donen en les vies genitals masculines —la maduració— i d'altres tenen lloc en les vies genitals femenines —la capacitació—. Ambdós

mecanismes asseguruen, en definitiva, que els dos gàmetes puguin trobar-se en el lloc de la fecundació i realitzar aquesta.

### Maduració i capacitació

En els Mamífers Euteris els espermatozoides testiculars no són aptes per fecundar directament els oòcits. Un cop els espermatozoides han sortit del testicle sofreixen una sèrie de transformacions morfològiques i fisiològiques en un òrgan especialitzat en aquesta funció: l'epidídim. Al conjunt d'aquestes modificacions s'anomena maduració dels espermatozoides. Els canvis més notoris són: compactació de la cromatina nuclear per increment dels ponts disulfur, reforçament de la regió cefàlica per formació d'altres ponts disulfur en el citoplasma perinuclear, diferenciació del segment equatorial i beina postacrosòmica, modificacions de la membrana plasmàtica i acrosòmica, adquisició de la motilitat de progressió, etc... A conseqüència d'aquestes transformacions els espermatozoides s'han modificat cel·lularment a fi d'adaptar-se a les característiques morfològiques dels oòcits i adquirir la propietat funcional de ser aptes per a la fecundació.

Tot i que els espermatozoides en acabar el seu trànsit epididimal ja tenen desenvolupada la propietat de fecundar, una sèrie complexa de mecanismes bloquegen aquesta facultat (a-

Fig. 1

Reacció acrosòmica espontània en l'ejaculat. Inici del fenomen de vesiculació.



parició de glucoproteïnes superficials inhibidores, poca permeabilitat als ions  $Ca^{2+}$ , etc...). En aquestes condicions, els espermatozoides, acompanyats pel plasma seminal són inseminats a les vies genitals femenines a on s'inicia el procés de capacitat dels gàmetes. A part del significat evolutiu que té l'aparició d'un òrgan especialitzat, l'epidídim, a on sota el control hormonal els espermatozoides maduren, les transformacions que aquests sofreixen s'han de valorar com una adaptació de la morfologia i fisiologia cel·lular a l'aparició de les cobertes oocitàries.

El procés de capacitat consisteix fonamentalment en un conjunt de transformacions fisiològiques que afecten les propietats dels espermatozoides. Durant el trànsit dels espermatozoides per les vies genitals femenines es donen importants canvis en les propietats de membrana i en el metabolisme, fets que possibiliten que els espermatozoides tornin a recuperar la seva propietat fecundant. L'experiència pràctica en el camp de la fecundació *in vitro* indica que el fenomen de la capacitat és un succés discret i relativament senzill de reproduir en les condicions de laboratori, característiques no aplicables al fenomen de la maduració que fins avui no s'ha pogut aconseguir en condicions experimentals. Com a culminació de la capacitat es donen tres fenòmens d'importància cabdal per dur a terme eficaçment la fecundació: la reacció acrosòmica, la motilitat hiperactivada i les transformacions de les propietats de membrana a nivell del segment

equatorial i de la beina postacrosòmica.

Malgrat la complementaritat d'ambdós fenòmens, maduració i capacitat, cal destacar les especificitats funcionals diferenciadores. Mentre la maduració representa l'adquisició per part dels espermatozoides de tot el potencial fecundant adaptat a les peculiars característiques morfològiques dels oòcits, la capacitat ha d'entendre's com el mecanisme que assegura que aquest potencial es desenvolupi, es faci de forma coordinada, i sigui eficaç per penetrar les cobertes oocitàries i per incorporar l'espermatozoide al citoplasma de l'oòcit i fusionar-se els nuclis dels gàmetes. Qualsevol circumstància que modifiqui els paràmetres propis de la maduració o capacitat pot tenir conseqüències dramàtiques en la realització de la fecundació *in vivo*.

Des d'aquesta perspectiva interessa de conèixer, perquè és un dels aspectes clau de la biologia de la reproducció, com es regulen òptimament els fenòmens estimulats per la capacitat a fi que en el punt a on es donarà la fecundació hi arribin els espermatozoides plenament preparats per dur-la a terme.

### Regulació de la capacitat

Aquesta qüestió és una de les grans paradoxes de la fecundació *in vivo* dels Mamífers Euteris. Mentre

que en els animals de fecundació externa és possible l'existència d'una estreta relació entre els espermatozoides i els oòcits per regular la fecundació, quan la fecundació esdevé interna els mecanismes reguladors semblen no dependre exclusivament dels propis gàmetes. Diverses dades fan sospitar aquest fet. Els espermatozoides dels Euteris, per exemple, en condicions *in vitro* i *in vivo*, no desenvolupen sincrònicament la reacció acrosòmica. Per altre part, el mateix gruix de les cobertes oocitàries, especialment la zona pel·lúcida, fa poc probable que els oòcits puguin regular el desenvolupament dels fenòmens propis de la fecundació.

L'aparició d'un grau d'asincronia en el desenvolupament de la reacció acrosòmica representa una peculiar adaptació a la Biologia de la Reproducció dels Mamífers Euteris. En aquest grup, el moment de la inseminació i l'ovulació no són dos successos sincronitzats, ni la capacitat es desenvolupa d'una forma homogènia en totes les cèl·lules d'una mateixa població gamètica. Però, per altra part, l'eficiència reproductiva obliga a establir uns mecanismes que coordinin aquesta heterogeneïtat temporal de la capacitat amb l'asincronia d'arribada dels gàmetes al lloc de la fecundació. Si la diversitat cel·lular, quant a resposta als estímuls capacitants, pot valorar-se com una adaptació a la diferència de temps que hi ha entre la inseminació i l'ovulació, no és menys cert que han d'existir uns mecanismes que permetin regular aquesta heterogeneïtat per tal de garantir que en el

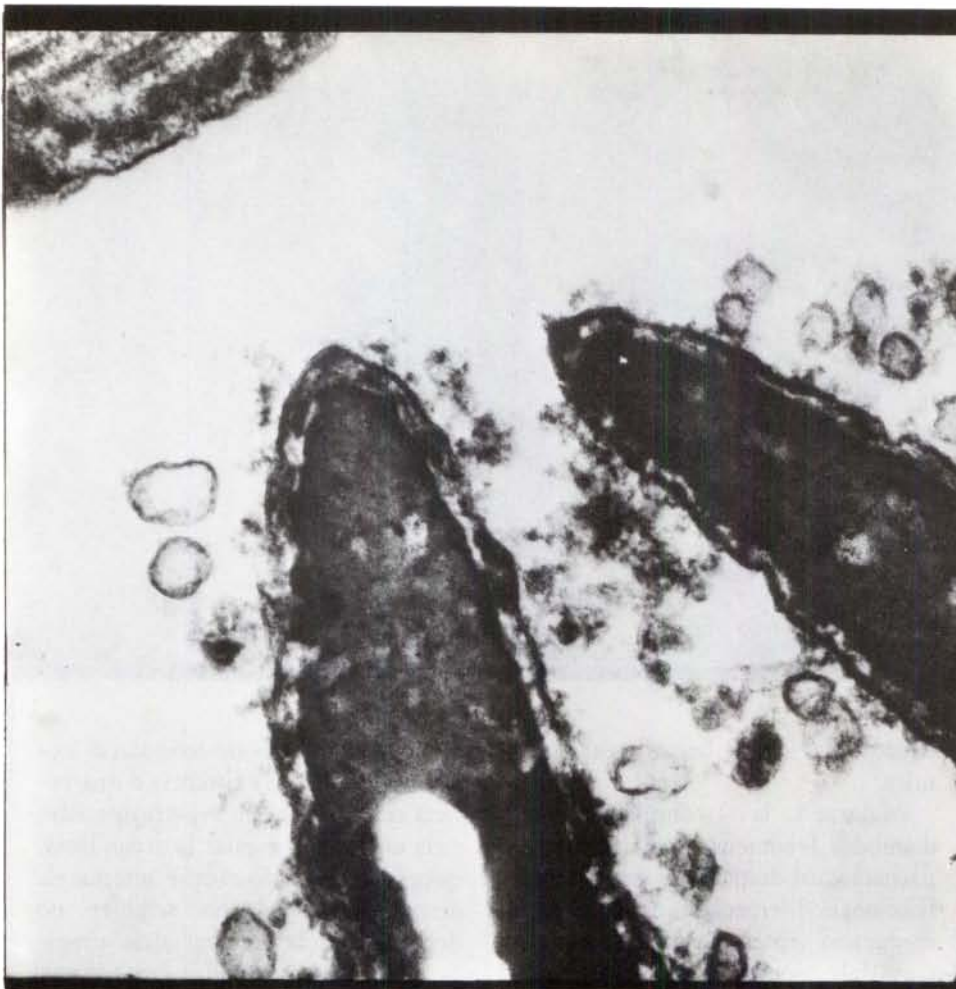


Fig. 2

Reacció acrosòmica espontània en l'ejaculat. La vesiculació comporta el lliurament del contingut enzimàtic de l'acrosoma.

punt de fecundació arribin els espermatozoides perfectament capacitats. Donat que l'aparició d'unes importants cobertes oocitàries durant l'evolució dels Mamífers Euteris ha provocat la pèrdua de la propietat dels oòcits de regular els principals successos de la fecundació, l'alternativa evolutiva ha estat de traslladar aquest control a la influència que el propi tracte genital femení pot exercir sobre la fisiologia dels espermatozoides.

### Control de la reacció acrosòmica

Per una errònia extrapolació dels fenòmens que es donen en els animals de fecundació externa, s'havia generalitzat l'opinió que la modulació del sincronisme i la penetració de les cobertes dels Mamífers Euteris també s'assolien per la regulació que els propis oòcits feien de la reacció acrosòmica. Les darreres dades que es disposen han modificat aquest criteri. Ni els oòcits dels Euteris semblen ésser tant determinants d'aquesta regulació,

ni els enzims acrosòmics són els únics factors responsables de la penetració de les cobertes oocitàries. Malgrat que en els animals de fecundació externa el control de la reacció depèn d'uns factors lliurats pels propis oòcits, en els Euteris els factors capacitants lliurats per les vies genitals femenines venen a assolir aquella funció. Per les dades experimentals que es disposen sembla que el conjunt de fenòmens que donen peu a la reacció acrosòmica són la culminació, en el temps, del propi procés de la capacitat.

És la pròpia capacitat qui estimula la reacció acrosòmica i regula el seu desenvolupament seqüencial en el temps. L'únic mecanisme que exerceix una influència reconeguda en el desenvolupament de la reacció són els nivells extracel·lulars de  $Ca^{2+}$  i com, al llarg del trànsit per les vies genitals femenines, els espermatozoides modifiquen les seves concentracions intracel·lulars d'aquest ió. Des d'aquesta perspectiva pot afirmar-se que la reacció acrosòmica és un fenomen totalment intrínsec dels espermatozoides i independent de l'ambient tubal, de les cèl·lules de la capa granulosa i de la zona pel·lúcida, i dels propis oòcits. Cap d'aquestes estructures sembla ésser crítica per realitzar-

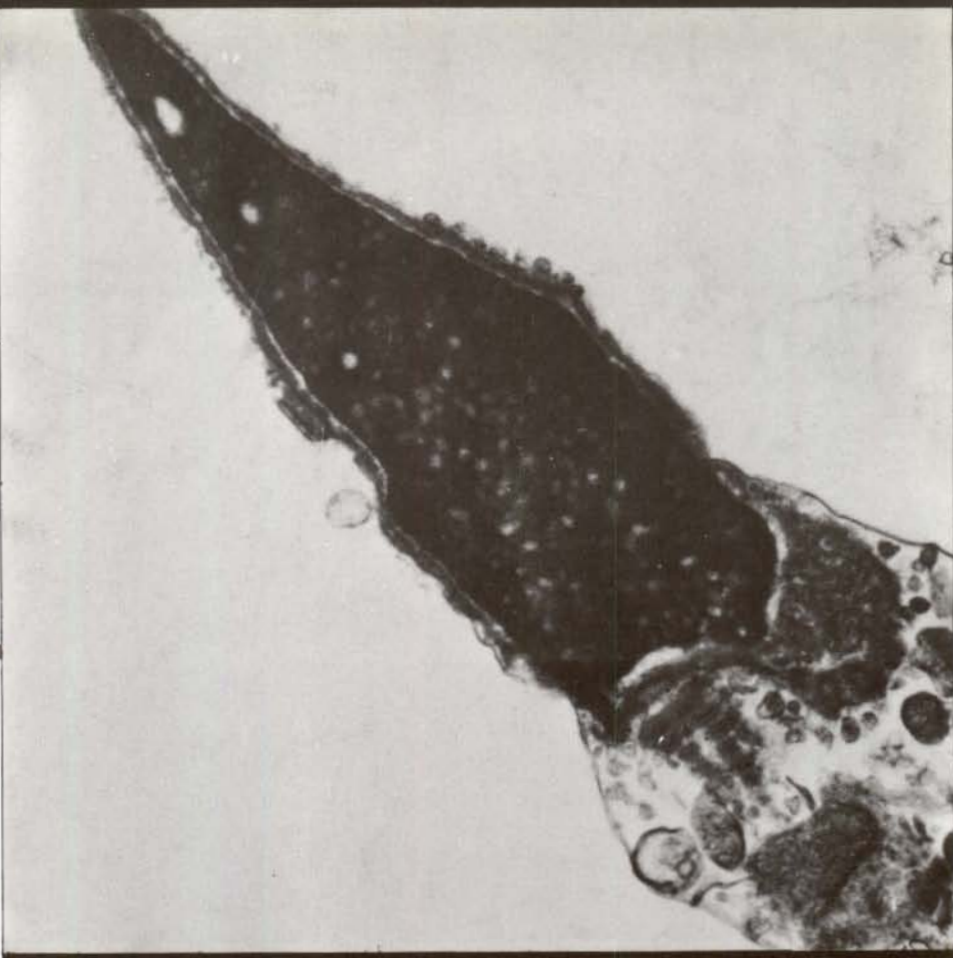
se la reacció acrosòmica dels Mamífers Euteris. Oviament, gràcies a aquesta independència avui és possible la fecundació *in vitro*. No obstant això, tal com diu Bedford (1983a), "és una mica massa fort excloure completament la possibilitat que els oòcits tinguin un paper residual en l'estimulació de la reacció acrosòmica", encara que per les dades que disposem hi ha massa evidències que demostren el seu paper irrellevant.

Per aconseguir que en el moment de trobar-se els espermatozoides amb els oòcits conservin encara totes les seves propietats fecundants, cal que hi hagi un mecanisme que reguli la reacció acrosòmica. En aquests moments no es disposen de massa dades que permetin avançar una hipòtesi concreta i plausible. No obstant això, algunes observacions experimentals permeten suggerir algunes explicacions noves per a aquesta regulació.

Per a Bedford (1983b), el principal objectiu de la regulació de la capacitat és l'obtenció, a nivell de la població total d'espermatozoides, de la coordinació d'un fenomen cel·lular intrínsecament heterogeni: la reacció acrosòmica. Ja s'ha assenyalat anteriorment que l'aparició de la reacció es dona com a culminació d'una cadena d'esdeveniments, iniciats a partir del moment que els espermatozoides són inseminats, al marge del fet concret de l'ovulació. Si en aquestes condicions no es produeix la modulació d'aquests fenòmens, si no s'introdueix una certa flexibilitat a aquesta programació intrínseca de la reacció acrosòmica, no podrà coordinar-se la reacció acrosòmica amb l'arribada de les cèl·lules

Fig. 3

Reacció acrosòmica espontània en l'ejaculat. Al final de la reacció acrosòmica, la regió cefàlica de l'espermatozoide, amb l'única excepció del segment equatorial, només està coberta per la membrana interna de l'acrosoma.



sexuals al punt de fecundació. Llavors, segons l'opinió de Bedford (1983b), el possible mecanisme de regulació fora variar el temps que cada espermatozoide, o grups que tinguin un mateix comportament de resposta davant l'estímul de capacitació, passa en els diferents compartiments del tracte genital femení.

## Modificació del moviment

**D**urant el temps de capacitació, els espermatozoides modifiquen les característiques del seu moviment. Els gàmetes, a part de presentar unes ondulacions flagelars de gran amplitud, mostren un moviment flagelar anomenat d'hiperactivació, a on el batec de gran amplitud coexisteix amb l'aparició de forts cops de la cua dels espermatozoides, similar a un cop de fuet. La motilitat d'hiperactivació, a part de poder ésser un mecanisme que també contribueix indirectament a la regulació de la sincronia del trobament dels gàmetes, ha d'interpretar-se fonamentalment com una força complementària per realitzar la penetració de les cobertes oocitàries, especialment la zona pel·lúcida. Fleming i Yanagimachi (1982), Katz i Overstreet (1980), Katz i Yanagimachi, (1980)(1981) Yanagimachi (1981).

No existeixen massa dades que permetin atribuir un altre paper específic al moviment d'hiperactivació, però el que és cert és que sense donar-se la

hiperactivació del moviment no hi ha fecundació. Ja que algunes dades qüestionen que els enzims acrosòmics siguin els únics causants de la penetració de les cobertes oocitàries, diversos autors han suggerit que el moviment d'hiperactivació aporta una força física per la penetració de les gruixudes cobertes oocitàries dels Euteris. La penetració de les cobertes dels Euteris és un fenomen difícilment explicable si únicament es té present l'acció lítica dels enzims acrosòmics. La pròpia especificitat d'aquests enzims, la resistència mecànica de la zona pel·lúcida, les característiques morfològiques dels caps dels espermatozoides, l'angle d'atac en el moment de la penetració, fan sospitar l'existència d'una força física que deu ésser cabdal per dur a terme amb èxit la fecundació. És perfectament plausible que el moviment d'hiperactivació, donat en un moment crític de la penetració *in vivo*, fos suficient per travessar la gruixuda coberta oocitària dels Euteris.

Els espermatozoides de l'espècie humana, a diferència dels de la resta de Mamífers Euteris, per les característiques de la seva regió cefàlica, semblen estar poc adaptats a aprofitar la contribució física que el moviment

d'hiperactivació aporta en el moment de la penetració. La manca d'una regió subacrosòmica estabilitzada per ponts disulfur, el poc contingut de cisteïna del nucli i el propi perfil de tot el cap són aspectes que evidencien un cert grau d'inadaptabilitat a la interacció física espermatozoides - cobertes oocitàries. No obstant això, aquesta qüestió ha d'ésser més aprofundida i mereix complementar-se amb una sèrie d'estudis funcionals i morfològics.

## Conclusions

**S**egons aquestes dades podem concloure que la necessitat de capacitar *in vivo* els espermatozoides dels Mamífers Euteris, més que una resposta a l'aparició de la fecundació interna, representa una adaptació de la fecundació als canvis funcionals i estructurals que s'han donat a nivell dels oòcits. Principalment, la capacitació esdevé un mecanisme que regula i coordina l'aparició de la reacció acrosòmica, controla el desenvolupament

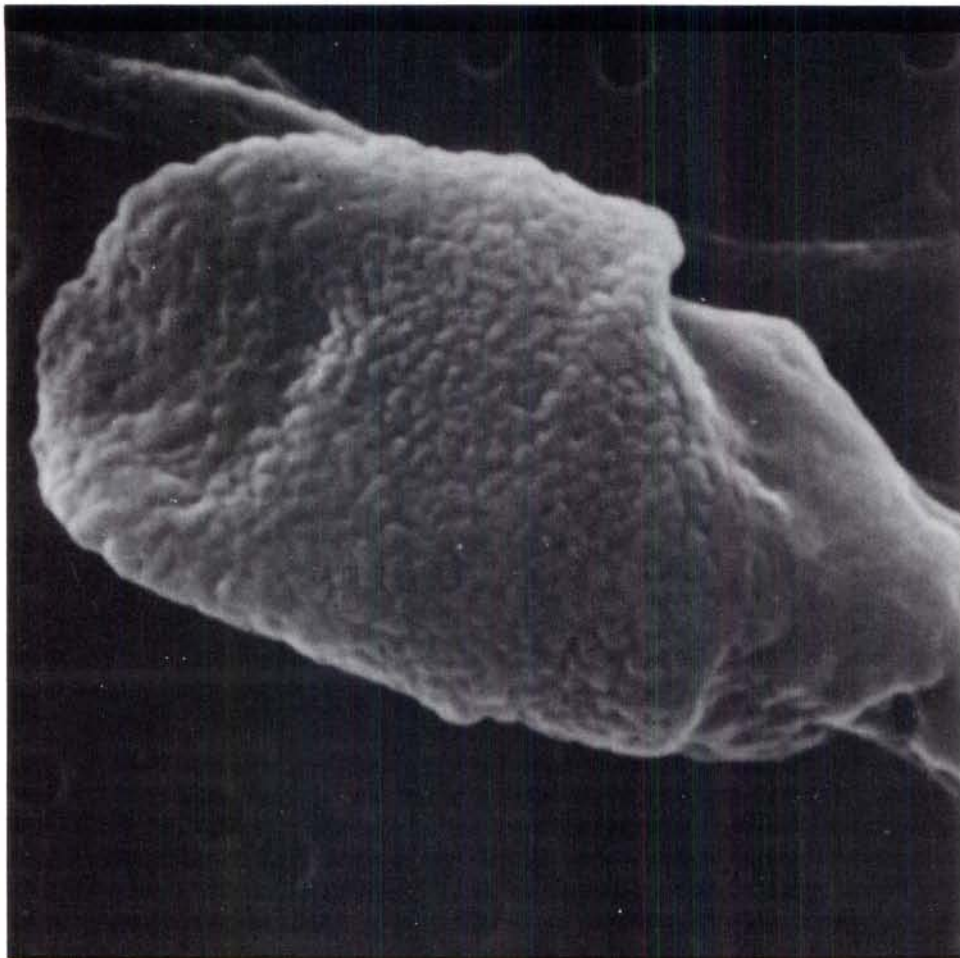


Fig. 4  
Probable aspecte de la reacció acrosòmica espontània, en la fase de vesiculació, al microscopi electrònic d'Scanning.

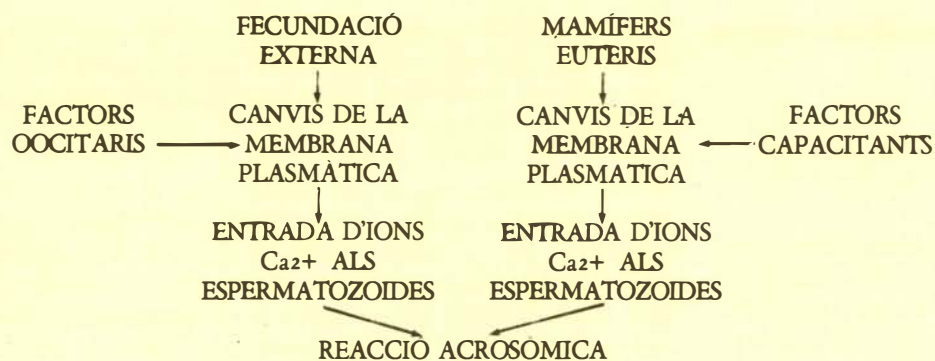


Fig. 5  
Diferències en la regulació de la reacció acrosòmica segons les característiques de la biologia de la reproducció (Esquema inicial de Bedford 1983a).

del moviment d'hiperactivació per tal de travessar les cobertes oocitàries, adapta part de la membrana plasmàtica i acrosòmica per realitzar la fusió de gàmetes i possibilita la descondensació del nucli dels espermatozoides. Sense donar-se aquests fenòmens, la fecundació en els Mamífers Euteris esdevindria impossible.

## Bibliografia

1. BEDFORD, J.M. "Form and function of eutherian spermatozoa in relation to the nature of egg vestments", en *Fertilization of human egg in vitro*, H.M. Beier i H.R. Linder (eds.), Springer Verlag, Berlin, 133, 1983a.
2. BEDFORD, J.M. "Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in Eutherian Mammals." *Biol. Reprod.* 28, 108, 1983b.
3. FLEMING, A.D., YANAGIMACHI, R. "Fertile life of acrosome-reacted guinea pig spermatozoa." *J. Exp. Zool.* 220, 109, 1982.
4. "Human gamete biology and in vitro fertilization". *Gamete Research*. Tot el volum 9, 2, dedicat a aquest tema, 1984.
5. KATZ, D.F., OVERSTREET, J.W. "Mammalian sperm movement in the secretions of the male and female tracts", en *Testicular development, structure, and function*, E. Steinberger i A. Steinberger (eds.), Raven Press, Nova York, 481, 1980.
6. KATZ, D.F., YANAGIMACHI, R. "Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct." *Biol. Reprod.* 22, 759, 1980.
7. KATZ, D.F., YANAGIMACHI, R. "Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida." *Biol. Reprod.* 25, 785, 1981.
8. YANAGIMACHI, R. "Mechanisms of fertilization in Mammals", en *Fertilization and embryonic development in vitro*, L. Mastroianni i J.D. Biggers (eds.), Plenum Press, Nova York, 81, 1981.