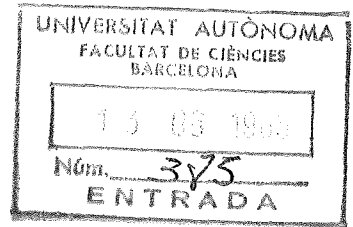


ANOMALIES CROMOSÒMIQUES AL MOMENT DE LA CONCEPCIÓ.

ESTUDI COMPARATIU DE LA FECUNDACIÓ IN VIVO I IN VITRO

Memòria presentada per Josep Santaló i Pedro
per aspirar al grau de Doctor en Ciències
per la Universitat Autònoma de Barcelona,
sota la direcció de la Dra. Anna M^a Estop i
Graells, Professor Titular de Biologia
Cel.lular de la Universitat Autònoma de
Barcelona.

Bellaterra, Juliol de 1985



La Dra. ANNA M^a ESTOP i GRAELLS, Professor Titular de Biologia Cel.lular de la Secció de Biològiques, Facultat de Ciències, de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA :

Que JOSEP SANTALÓ i PEDRO ha realitzat el treball "Anomalies cromosòmiques al moment de la concepció. Estudi comparatiu de la fecundació in vivo i in vitro" per a obtenir el títol de Doctor en Ciències, sota la meva direcció.

Aquesta tesi s'ha dut a terme en el Departament de Biologia Cel.lular de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, quinze de juliol de mil nou-cents vuitanta-cinc.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Josep Santaló i Pedro'.

Doctorand
Josep Santaló i Pedro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dra. Anna Mª Estop i Graells'.

Director de la Tesi
Dra. Anna M^a Estop i Graells

A Núria i Marta

Per a dissipar un dubte, qualsevol que sigui, cal una acció.

Tomàs Carlyle

El fet que la visió dels animals ens plagui tant, es deu sobretot que ens complau veure el nostre propi ésser tan simplificat davant nostre.

Schopenhauer

AGRAÏMENTS

A la Dra. Anna Estop i Graells, de qui he après el què sé del mètode científic. Pels seus valuosos suggeriments, estímul i direcció d'aquesta Tesi, sense els quals no hauria estat possible de dur-la a terme d'una forma coherent.

Al Dr. Josep Egozcue i Cuixart, cap del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona, a qui dec la idea del treball i l'empenta necessària per a realitzar-lo.

Al Dr. David G. Whittingham, de la Experimental Embriology and Teratology Unit del Medical Research Council, que va tenir l'amabilitat i l'interès d'ensenyar-me una part dels seus enormes coneixements en el camp de la biologia de la reproducció i l'embriologia.

Als Drs. Peter Glenister, de la Radiobiology Unit del Medical Research Council, i Rossi Albanese de la Pharmaceutical Division de la Imperial Chemical Industries, per la seva paciència en ensinistrar-me en les tècniques de fixació cromosòmica.

A tots els companys del Departament de Biologia Cel·lular, especialment a Lourdes Freixa, M^a del Mar Pérez i Vicenç Català, amb els que he compartit tantes hores de treball i divertiment. Per la paciència amb la què, sovint, s'han hagut de carregar per a fer-les possibles.

A tots els companys del grup de Citogenètica de l'Institut de Biologia Fonamental i de Biologia General de Medecina, per totes les hores grates que hem passat junts.

A Jordi Cantó, cap del Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona, per la seva preocupació i eficàcia en el subministrament dels animals d'experimentació.

A Pilar Grao, molt especialment, pel mecanografiat desinteressat d'aquesta Tesi.

A Mercè Pons, pel seu interès i cura en la correcció del català.

Al Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya, pel seu ajut econòmic que ha contribuït a l'acabament d'aquesta Tesi.

I a tots aquells que, d'una manera o altra, m'han ajudat durant tot aquest temps.

A tots ells, moltes gràcies.

INDEX

	<u>Pàg.</u>
Sumari	V
Summary	VII
1. Introducció	1
1.1. Mecanismes de fecundació en mamífers	1
1.1.1. Fenòmens pre-zigòtics	4
1.1.1.1. La maduració dels espermatozoides	4
1.1.1.2. L'ejaculació	7
1.1.1.3. La capacitació dels espermatozoides ...	7
1.1.1.4. La reacció acrosòmica	9
1.1.1.5. La interacció amb les cobertes oòcitàries	
- Penetració	14
1.1.1.5.A. <u>Cummulus oophorus</u>	14
1.1.1.5.B. Zona pel·lúcida	16
1.1.1.6. La fusió	18
1.1.2. Fenòmens postzigòtics	20
1.1.2.1. Activació dels gàmetes	20
1.1.2.1.A. Canvis idònics	20
1.1.2.1.B. Reacció cortical	23
1.1.2.1.C. Blocatge de la polispèrmia .	23
1.1.2.2. Formació de pro-nuclis	25
1.1.2.3. Primera divisió embrionària	27
1.2. Problemàtica reproductiva a l'espècie humana	32
1.3. Origen de les anomalies cromosòmiques	34
1.3.1. Origen de les anomalies estructurals	34
1.3.2. Origen de les anomalies numèriques	36
1.4. Estudi de les alteracions cromosòmiques	42
1.5. Utilització d'un model animal	44
1.6. La fertilització <u>in vitro</u> com a possible font	
d'anomalies cromosòmiques	46
1.7. Estudi de mutàgens	47
1.8. Objectius i justificació del treball	51

	<u>Pàg.</u>
2. Material i Mètodes	52
2.1. Fonaments de les tècniques de fertilització <u>in vitro</u> i cultiu d'embrions pre-implantacionals	52
2.1.1. Desenvolupament i característiques del medis de cultiu	52
2.1.1.1. Medi de capacitació-Fertilització: T ₆ .	52
2.1.1.2. Medi de cultiu d'embrions: M ₁₆	58
2.1.1.3. Medi de manipulació: M ₂	61
2.1.2. Condicions de cultiu	62
2.1.3. Font d'òdits	65
2.1.4. Font d'espermatozoides	71
2.1.5. Factors que afecten la fertilització <u>in vitro</u> .	73
2.1.5.1. Condició dels gàmetes	74
2.1.5.2. Condicions de pre-incubació	77
2.1.5.3. Condicions d'inseminació	78
2.1.5.4. Condicions d'incubació	81
2.2. Metodologia experimental de la fertilització <u>in vivo</u> i <u>in vitro</u>	83
2.2.1. Material d'experimentació	83
2.2.1.1. Animals emprats	83
2.2.1.2. Medis de cultiu-Preparació	83
2.2.1.3. Altres solucions	87
2.2.2. Mètodes emprats	88
2.2.2.1. Superovulació	88
2.2.2.2. Fertilització <u>in vivo</u>	88
2.2.2.3. Fertilització <u>in vitro</u>	90
2.3. Metodologia experimental dels estudis citogenètics ...	93
2.3.1. Fixació	93
2.3.2. Tinció	95
2.3.2.1. Uniforme	95
2.3.2.2. Bandes C	96
2.3.2.3. Bandes G	98
2.3.3. Observació	98
2.4. Estudi de mutàgens	100
2.4.1. Característiques i propietats del mutàgen emprat	100

	<u>Pàg</u>
2.4.1.1. Característiques físico-químiques	100
2.4.1.2. Activitat biològica	101
2.4.2. Metodologia experimental	102
3. Resultats	103
3.1. Característiques dels gàmetes obtinguts	103
3.1.1. Oòcits	103
3.1.2. Espermatozoides	106
3.2. Inseminació <u>in vitro</u>	113
3.3. Desenvolupament	117
3.4. Primera divisió embrionària	119
3.5. Descripció de les anomalies cromosòmiques estudiades ..	120
3.5.1. Definició	120
3.5.2. Anomalies estudiades	120
3.5.3. Casos especials	128
3.5.3.1. Analitzables	128
3.5.3.2. No analitzables	128
3.6. Anàlisi estadística	140
3.7. Recopilació de dades	142
3.7.1. Característiques generals de la mostra	142
3.7.2. Anomalies numèriques i estructurals	144
3.7.3. Origen de les poliploïdies	146
3.7.4. Contribució dels pro-nuclis masculins i femenins	149
3.8. Estudi de mutagens	151
3.8.1. Característiques generals	151
3.8.2. Anomalies numèriques i estructurals	151
3.8.3. Origen de les poliploïdies	154
3.8.4. Origen de les aneuploïdies	156
3.8.5. Anàlisi en metafase II	156
4. Discussió	161
4.1. Dades derivades de les tècniques de fertilització <u>in vitro</u> i cultiu d'embrions	161

	<u>Pàg.</u>
4.2. Anàlisi citogenètica	163
4.2.1. Característiques generals	163
4.2.2. Aneuploïdies	164
4.2.3. Poliploïdies	167
4.2.3.1. Triploïdies	168
4.2.3.2. Tetraploïdies	171
4.2.3.3. Pentaploïdies	172
4.2.4. Anomalies estructurals	172
4.2.5. Freqüència total d'anomalies observades	172
4.3. Comparació amb les estimacions amb l'espècie humana ..	174
4.3.1. Incidència d'aparició d'anomalies cromosòmiques en ambdues espècies	174
4.3.2. Problemàtica de la fertilització in vitro en humans	179
4.4. Estudi del mutagen	182
4.4.1. Aneuploïdies	182
4.4.2. Poliploïdies	183
4.4.3. Anomalies estructurals	183
4.4.4. Possible mecanisme d'acció	183
5. Conclusions	187
6. Bibliografia	189

Sumari

La importància de les anomalies cromosòmiques en els problemes d'infertilitat ha estat àmpliament confirmada per diversos autors. S'ha estimat que la freqüència d'aberracions cromosòmiques dels zigots humans pot anar des d'un 8-10% (Kajii i Mikamo, 1978) fins a un 50% (Boué i col., 1975) al moment de la concepció.

Una estimació directa de la incidència primària d'aparició de les anomalies cromosòmiques després de la fecundació en humans és molt difícil d'obtenir pels problemes de tipus tècnic i ètic que comporta. De la mateixa manera és difícil de realitzar una anàlisi directa de les característiques cromosòmiques dels gàmetes, fonamentalment els femenins, a causa de la seva inaccessibilitat inherent.

De tota manera s'ha suggerit (Bond i Chandley, 1983) que l'espècie humana presenta un major nombre d'anomalies cromosòmiques al moment de la fecundació que no pas altres espècies de mamífers. Aquest fet ha passat malgrat que les noves tècniques de fertilització in vitro (FIV), cada cop més exteses en el tractament de determinats tipus d'infertilitat, podrien carregar l'espècie humana amb una font extra d'aberracions cromosòmiques derivades dels processos de fecundació fora del tracte genital femení.

L'estudi de la freqüència primària d'aparició d'anomalies cromosòmiques en una població de mamífers (els ratolins), mitjançant l'anàlisi de la primera divisió embrionària, ha permès abordar aquest problema a través d'un enfocament experimental lliure de les limitacions ètiques i tècniques a les que ja hem fet esment.

Per aquesta raó s'ha desenvolupat un mètode (Fraser i Maudlin, 1979) consistent en el cultiu dels zigots de ratolí recent fecundats en un medi amb antimitòtic que impedeix la singàmia, de manera que els complements d'origen matern i patern romanen separats i fàcilment distingibles l'un de l'altre. Mercès a aquest sistema es pot atribuir l'origen, masculí i femení, de cada anomalia cromosòmica observada alhora que s'obté la incidència d'aberracions cromosòmiques en el moment de la concepció.

Mitjançant la comparació de les característiques cromosòmiques de la primera divisió zigòtica d'una població d'embrions de ratolí fecundats in vivo amb una de fecundats in vitro, s'ha pogut esbrinar quin és l'efecte de la tècnica de FIV sobre la dotació cromosòmica dels embrions que se'n deriven.

D'altra banda la possibilitat de manipular els donants dels gàmetes amb substàncies de suposat efecte genotòxic ofereix l'oportunitat d'utilitzar aquests estudis com a test de mutagenicitat per a certs tipus de compostos amb unes característiques concretes.

Seguint aquest disseny experimental s'han detectat un total d'anomalies cromosòmiques al moment de la concepció que representen un 20.74% dels zigots fecundats in vivo, dels quals un 8.41% són aneuploides, un 10.37% poliploides i un 1.76% presenten anomalies estructurals.

Pel que fa a l'aportació dels gàmetes, la incidència d'aneuploïdies (un 4%) i d'anomalies estructurals (al voltant del 0.7%) s'ha observat que és igual en ambdós sexes.

D'altra banda l'anàlisi dels embrions fecundats in vitro mostra que un 21.39% presenten anomalies cromosòmiques, dels quals el 5.42% són aneuploïdies, el 14.23% són poliploïdies i el 1.74% tenen anomalies estructurals.

Aquests resultats indiquen que, en general, les tècniques de FIV no augmenten el nombre d'anomalies detectades en la primera divisió, tret d'un increment significatiu del nombre de dispèrmies i del nombre d'espermatozoides diploides que intervenen en la fecundació. Aquesta darrera observació confirma l'existència d'una selecció pre-zigòtica exercida pel tracte genital femení en contra dels espermatozoides morfològicament anòmals.

Pel que fa a la utilització de la primera divisió embrionària com a test de mutagenicitat es confirma llur interès, en detectar-se un tipus d'acció de la substància emprada (la BPL) difícilment observable a través d'altres proves clàssiques de detecció del caràcter genotòxic d'un compost, com és la formació d'òdits diploides a causa de la no-extrusió del segon corpuscle polar.

Summary

The importance of chromosomal abnormalities in reproductive failures has been confirmed by several authors. It is estimated that the frequency of chromosomally abnormal human zygotes at the time of conception may range from 8-10% (Kajii and Mikamo, 1978) to 50% (Boué et al., 1975).

A direct estimate of the number of chromosomally abnormal human conceptus is difficult to obtain because of ethical and technical difficulties. Likewise, a direct study of human gametes has been limited, mainly for human oocytes, because of the problems involved in their obtention.

It has been suggested that more conceptions are lost through chromosome imbalance in man than in other mammalian species (Bond and Chandley, 1983). This has led to the concern that in vitro fertilization (IVF) procedures, which have become a common technique for some infertility problems, would load the human species with an extra source of chromosome abnormalities.

Fraser & Maudlin (1979) developed a mouse experimental system, of first embryonic cleavage chromosome analysis which can be used as a model for man. It involves the culture of mouse embryos in a medium containing antimitotic to arrest the cleaving process before singamy is reached. Thus the male and female chromosome sets do not mingle, but remain in separate clusters, which permits to assess the parental origin and incidence of chromosomal abnormalities at conception.

Comparing the characteristics of first cleavage in vivo and in vitro fertilized embryos, it is possible to evaluate whether IVF techniques enhance the proportion of chromosomally abnormal embryos.

On the other hand, the possibility of injecting genotoxic compounds to gametic donors, permit the use of the first cleavage system as a mutagenic test for specific substances.

After the analysis of 1022 in vivo fertilized embryos we have seen that, in the mouse, 20.74% are chromosomally abnormal, among them, 8.41% show aneuploidy, 10.37% polyploidy and 1.76% structural rearrangments.

Comparing the origin of the abnormalities, the incidence of aneuploidy (4%) and structural rearrangements (0.7%) is the same for both sexes.

After the analysis of 1033 in vitro fertilized embryos, we have seen that 21.39% have a chromosome abnormality, among them 5.42% are aneuploid 14.23% are polyploid and 1.74% have structural rearrangements.

These results indicate that, in mice, the exposure of the fertilizing gametes to an in vitro environment is not a source of extra chromosomal abnormalities, except for an increase in the level of polyspermy and of diploid spermatozoa that fertilize in vitro. This later confirms the existence of a form of prezygotic selection exerted by the genital female tract against the morphologically abnormal spermatozoa.

Upon the use of first cleavage analysis as a mutagenic test, our data stress its importance. We have detected a type of action that would be hard to assess through a classic mutagenic test: the production of diploid oocytes due to the non extrusion of second polar body.

1. INTRODUCCIÓ

El coneixement dels mecanismes pels quals els gàmetes masculins i femenins adquireixen llur capacitat fecundant i efectuen els fenòmens complexos de la fecundació en mamífers és bàsic a fi de comprendre els problemes que sorgeixen durant aquest procés.

Malgrat el gran avenç que ha suposat l'aplicació de la tècnica de fertilització in vitro (FIV) per assolir la major part d'aquests coneixements, cal tenir en compte que si bé poden ser indicatius del què succeeix realment in vivo, en altres casos el model de fertilització descrit no es correspondria amb la realitat fisiològica in vivo. D'altra banda s'han detectat gran nombre de diferències intraspecífiques que fan que no es pugui donar un model més o menys general de la fecundació en mamífers, sinó una sèrie de dades vàlides només per a l'espècie estudiada en concret.

1.1. Mecanismes de fecundació en mamífers (fig. 1 i 2)

L'evolució cap a un tipus de fecundació interna i el desenvolupament d'extraordinàries cobertes per part de l'òocit dels mamífers han imposat una sèrie de processos encaminats a assolir una sincronia, tant física com temporal, entre els esdeveniments que desencadenen la penetració per part dels gàmetes masculins i la presència dels femenins.

Aquests processos en els espermatozoides són els següents: la maduració, la capacitació i la reacció acrosòmica (R.A.), els quals culminen en la penetració de les cobertes oocitàries, la fusió de membranes entre l'espermatozoide i l'òocit i l'activació dels gàmetes un cop produïda la fecundació. Tot seguit anem a parlar-ne amb més detall.

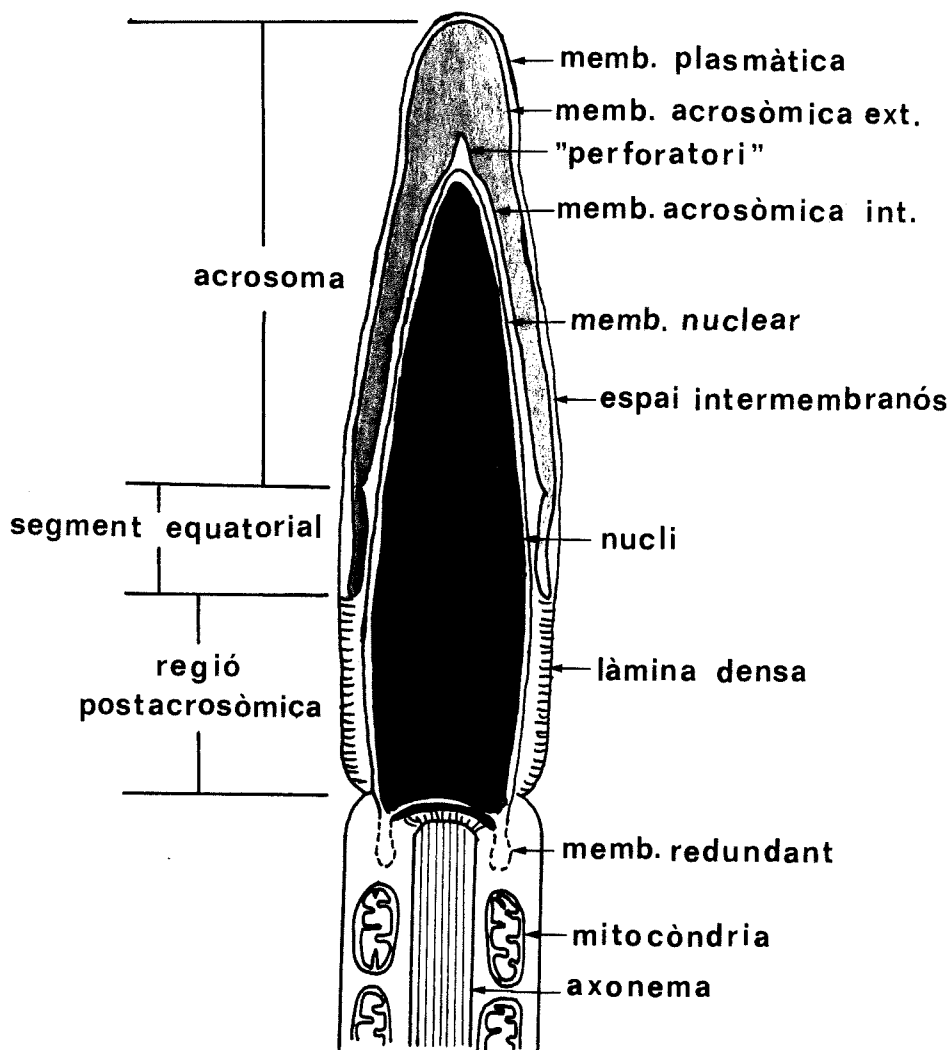


Fig. 1.- Esquema del tall longitudinal del cap i part de la peça mitjana d'un espermatozoide típic de mamífer on s'observa els seus components principals. El fals "perforatori" no és una estructura equivalent a la dels equinoderms sinó simplement la part anterior del citoplasma que recobreix el nucli. Com es pot veure a la membrana nuclear li manquen els porus excepte en la porció posterior al nucli que forma l'anomenada membrana redundant (segons Yanagimachi, 1981).

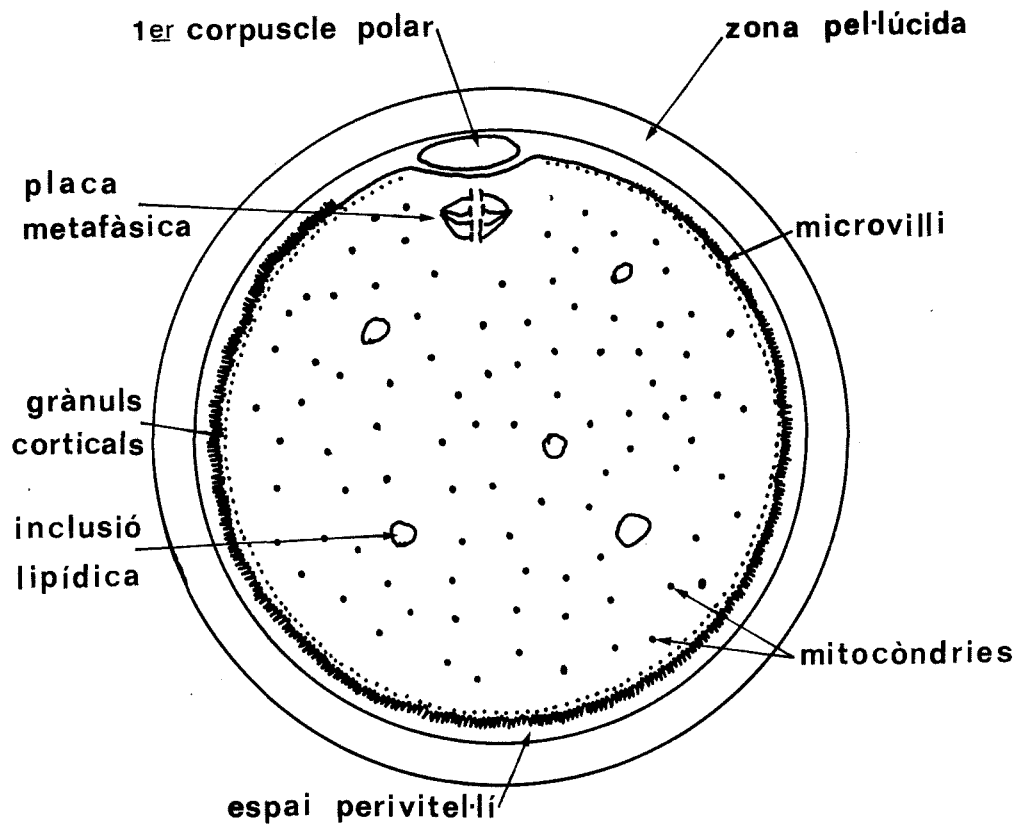


Fig. 2.- Esquema d'un oòcit de mamífer madur, ovulat en metafase II, lliure de les cèl.lules fol·liculars que formen el cumulus oophorus. (Els microvil·li han estat magnificats i no apareixen a escala).

1.1.1. Fenòmens pre-zigòtics

1.1.1.1. La maduració dels espermatozoides

La maduració comprèn tots els canvis que es produeixen en els espermatozoides al llarg del trànsit per l'epidídim (fig. 3) des que abandonen els testicles fins que són ejaculats.

Els canvis associats a la maduració són mediatos pels fluids segregats per les cèl.lules epididimals sota control androgènic (testosterona i 5 α dihidrotestosterona) i els seus objectius són l'adquisició, per part de l'espermatozoide, de:

- . Potencialitat de fecundar, a través de la reestructuració de l'acrosoma i la membrana plasmàtica, alhora que s'eviten R.A. incontrolades a destemps.

- . Capacitat de desenvolupar un moviment de progressió cap endavant.

- . Transformacions que permeten la viabilitat dels embrions, com per exemple, la condensació (protecció) i la reestructuració del material genètic i els canvis del metabolisme associats a la maduració.

Els canvis més importants que s'esdevenen en els espermatozoides durant la maduració són els següents:

CANVIS MORFOLÒGICS

S'elimina la gota citoplasmàtica, desplaçant-se des del cap fins a l'annulus, on es perd (Bedford, 1979).

Mentrestant, l'acrosoma s'aplana i el seu contingut es fa més dens (Harper, 1982) i augmenta la consistència de la beina mitocondrial mitjançant l'establiment de ponts de disulfur, tot això encaminat a augmentar la rigidesa de l'espermatozoide.

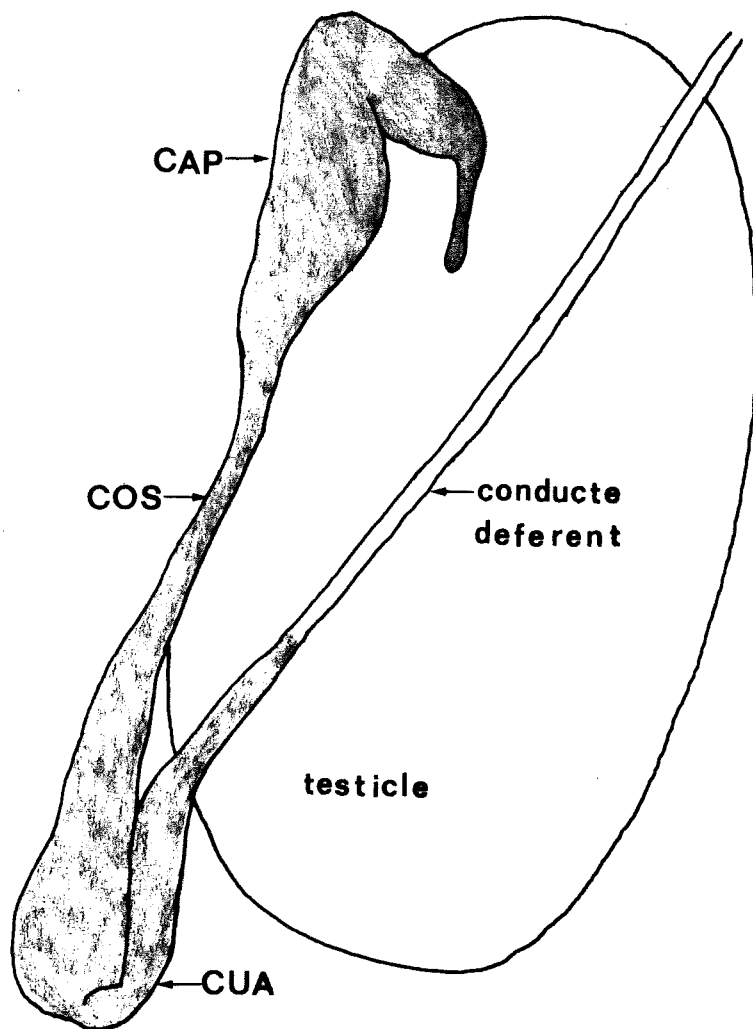


Fig. 3.- Esquema de l'epidídim (part ombrejada) d'un rosegador, dividit en les seves parts principals (cap o proximal, cos o mitjà, cua o distal). En algunes espècies, inclosa la humana, no apareix aquesta clara diferenciació en tres porcions. No s'ha representat el conducte epididimal que es troba a l'interior de l'epidídim molt entortolligat.

CANVIS DE MEMBRANA

S'incrementa la càrrega negativa de la membrana citoplasmàtica, fonamentalment per l'adquisició d'àcid siàlic (Holt, 1980), el qual actua com a protector immunològic per als espermatozoides, evitant que siguin ràpidament fagocitats als conductes genitals femenins. Al mateix temps la càrrega negativa afavoreix la repulsió entre membranes i impedeix la fusió de la membrana plasmàtica i acrosoma, amb la qual cosa s'evita una vesiculació-R.A. incontrolada.

Sembla ser que els receptors de superfície pel reconeixement i unió amb la zona pel·lúcida de l'òocit s'adquireixen també durant el trànsit per l'epidídim (Orgebin-Crist i Fournier-Delpech, 1982).

CANVIS A LA CROMATINA

Es produeix una deshidratació del nucli (continuació de la que ja sofreix durant l'espermioogènesi) i un increment en l'estabilitat i nombre dels ponts de disulfur entre les proteïnes bàsiques del nucli. Ambdós processos estan destinats a augmentar la compactació i protecció del material genètic.

CANVIS EN EL PATRÓ DE MOTILITAT

Al llarg del trànsit per l'epidídim els espermatozoides incrementen la seva capacitat de moure's, a través del paper regulador del AMPc, el qual actuaria fosforilant la tubulina i, potser, la dineïna de l'axone-ma (Tash i Means, 1982).

Per exemple: al rete testis tenen només un moviment vibracional o no en tenen cap; a l'epidídim proximal presenten un moviment circular lent, mentre que al caudal el tenen vigorós i de progressió cap endavant. Aquest moviment és possible que s'adquirís mercès a la FMP (forward motility protein) (Serres i Kann, 1984) que induiria canvis en la permeabilitat de la membrana al Ca^{2+} , el qual actuaria de regulador.

Això no vol dir que als epidídim els espermatozoides siguin mòbils, sinó que resten immobilitzats, o bé per la viscositat del medi (Usselman i Cone, 1983) o per acció de la carnitina present (Harper, 1983). Per

tant, necessitarien una activació del moviment que s'aconseguiria en contacte amb el fluid seminal (o per dilució in vitro) (Bellvé i O'Brien, 1983).

ALTRES CANVIS

- . Modulació de la incorporació del Ca^{2+} . S'inicia un cert blocatge de la penetració d'aquest ió que es completa durant l'ejaculació fins que desapareixerà per acció de la capacitat.

- . Aparició de ponts de disulfur entre tiols de cisteïna a l'axonema i estructures de sosteniment que donen més rigidesa per a suportar el moviment violent de la hiperactivació, especialment a la peça de connexió entre el cap i la cua.

1.1.1.2. L'ejaculació

Durant l'ejaculació els espermatozoides sofreixen canvis en estar en contacte amb el fluid seminal. En general s'incrementa encara més l'estabilitat de les membranes com a control de la R.A. i té lloc l'addició d'una substància decapacitant que probablement sigui un bloquejador de l'entrada de ions Ca^{2+} i que haurà d'ésser eliminat durant la capacitat.

1.1.1.3. La capacitat dels espermatozoides

La capacitat inclou tots els canvis que tenen lloc en l'espermatozoide després de l'ejaculació al tracte genital femení (o artificialment provo cada in vitro) destinats a permetre, segons Bedford (1983) el següent:

- . Que l'acrosoma reaccioni enfront de nivells fisiològics de Ca^{2+} per a desencadenar la R.A.

- . Que la cua expressi un patró de batec que doni lloc a l'anomenada hiperactivació.

. L'exposició de receptors de membrana, ja siguin inductors de la R.A. o de reconeixement i unió entre l'espermatozoide i l'oòcit.

HABILITAT PER A DUR A TERME LA R.A.

L'habilitat per a dur a terme la R.A. s'adquireix a través de:

. La retirada i/o la modificació dels components de superfície que restringien la motilitat de les proteïnes de membrana (bloquejadors) adquirits durant la maduració i l'ejaculació. Aquest fet provoca la formació d'àrees lliures de proteïnes que molt probablement podrien ser zones de fusió i vesiculació (Bearer i Friend, 1982).

. La reducció de la càrrega negativa neta de la membrana, permetent-se l'aproximació de les membranes per a donar la fusió-vesiculació (Vaidya i col., 1971).

. Canvis en la permeabilitat de la membrana enfront del Ca^{2+} . El nivell de Ca^{2+} intracel·lular a l'espai intermembranós es manté baix en l'espermatozoide després d'ejacular i abans de la capacitació per l'acció d'una ATPasa Ca^{2+} dependent que el bombeja cap enfora. La capacitació seria el mecanisme que eliminaria el blocatge de l'entrada de Ca^{2+} i, per tant, conduiria a l'absorció massiva de Ca^{2+} dins l'espai intermembranós desencadenant la R.A.

La importància del Ca^{2+} és extraordinària com a inductor de la R.A., per la fusió de membranes i la regulació de la motilitat. L'entrada en massa dels ions Ca^{2+} produeix un increment del pH a l'acrosoma que activa la fosfolipasa i l'acrosina. Aquests dos enzims desestabilitzen les membranes i afavoreixen l'aproximació entre elles de manera que es preparen per a la vesiculació de la R.A. (Meizel, 1978).

LES MODIFICACIONS EN EL PATRÓ DE MOVIMENT DEL FLAGEL

Les modificacions en el patró de moviment del flagel donen com a resultat la hiperactivació.

L'activació de l'adenilat ciclase per part del Ca^{2+} produeix un increment respiratori i metabòlic acompanyat de la probable fosforilació de

les proteïnes necessàries per a l'activació de la mobilitat.

La finalitat de la hiperactivació seria l'augment del moviment del medi que envolta els espermatozoides que permetria un increment de l'intercanvi metabòlic, la penetració de la zona pel·lúcida (ZP) i l'increment de la probabilitat de què els espermatozoides es trobin amb els oòcits in vivo (cal recordar el nombre baix d'espermatozoides que arriben al lloc de la fertilització in vivo, que és de l'ordre de les desenes o centenes, segons l'espècie).

1.1.1.4. La reacció acrosòmica (R.A.)

L'acrosoma és una estructura anàloga al lisosoma, derivada de l'aparell de Golgi (fig. 1) que conté una varietat d'enzims hidrolítics:

- . Hialuronidasa (HSA)
- . Acrosina i altres proteïnases
- . Esterasa
- . Neuraminidasa
- . Fosfatasa àcida
- . Fosfolipasa
- . Aril sulfatasa
- . β -N-acetil glucosaminidasa
- . Colagenasa

I d'altres encara desconegudes.

ESTADIS DE LA R.A.

La R.A. té lloc en dos passos (fig. 4):

- . La vesiculació:

És l'aparició de porus entre la membrana plasmàtica que recobreix l'acrosoma i la membrana externa de l'acrosoma. La vesiculació no té lloc per sobre el segment equatorial, el qual l'evita a través d'una estructura en forma de septes intermembranosos disposats hexagonalment (fig. 5) que estableixen les membranes en aquesta regió.

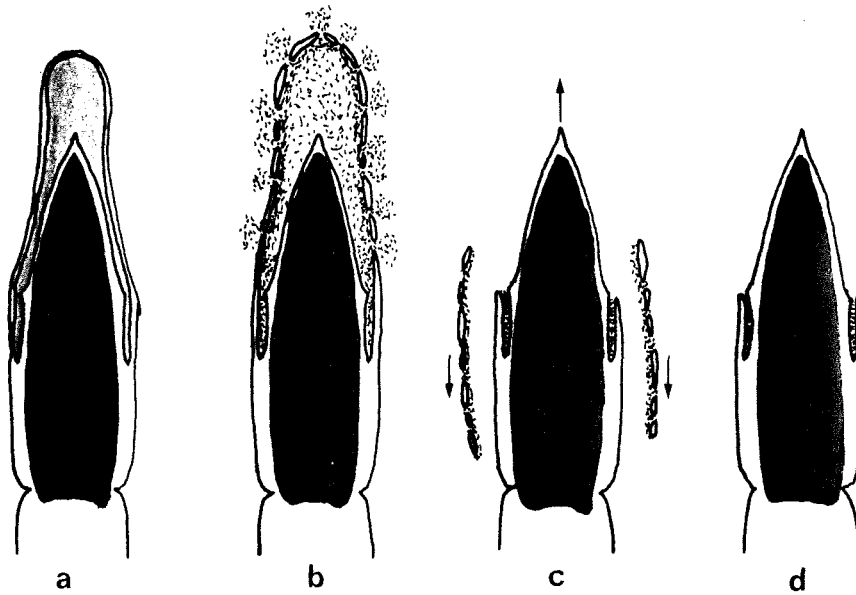


Fig. 4.- Esquema de les fases de la reacció acrosòmica (R.A.). Segons Yanagimachi (1981).

- a- l'espermatozoide abans de la R.A.
- b- vesiculació i dispersió de la matriu acrosòmica. Observi's que la vesiculació no té lloc a nivell del segment equatorial
- c- l'espermatozoide avança deixant el "fantasma" acrosòmic (compost de restes de vesícules i matriu acrosòmica) endarrere
- d- l'espermatozoide després de sofrir la R.A. La porció del segment equatorial roman intacta, mentre que la membrana interna de l'acrosoma ha quedat al descobert.

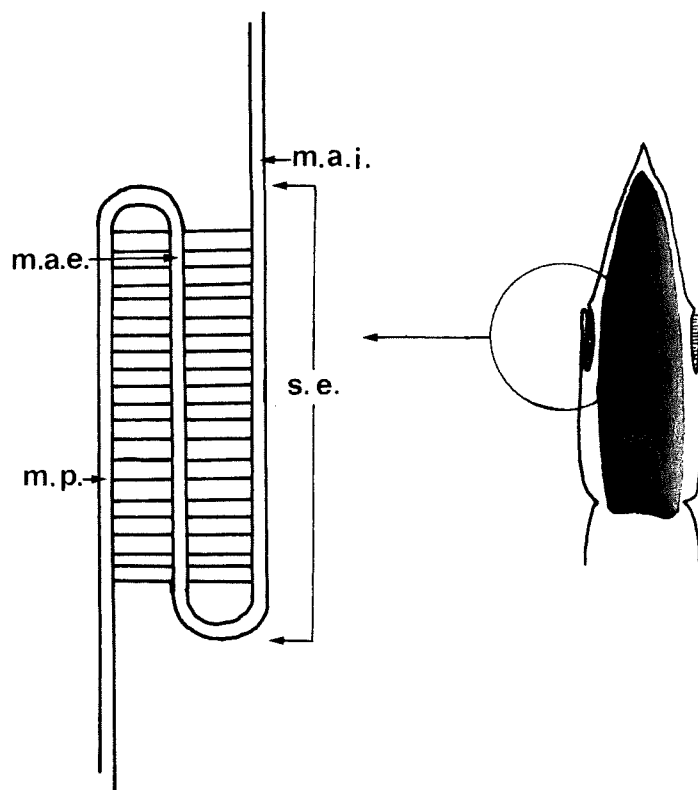


Fig. 5.- Esquema de la porció del segment equatorial de l'espermatozoi-
de després de la R.A. amb els septes transversals estabilitza-
dors.

(m.p.: membrana plasmàtica; m.a.e.: membrana acrosòmica externa;
m.a.i.: membrana acrosòmica interna; s.e.: segment equatorial)

. La dispersió de la matriu acrosòmica i el consegüent alliberament dels enzims que conté:

Alguns autors pensen que aquest fet estaria mediat per l'acció de l'acrosina del propi acrosoma (Perreault i col., 1982; Fraser, 1983b).

LES FUNCIONS DE LA R.A.

Les funcions de la R.A. són:

. Permetre l'exposició dels enzims de l'acrosoma que faran possible la penetració de les cobertes oocitàries.

. Posar en marxa canvis fisiològics a la membrana plasmàtica que re cobreix el segment equatorial i la regió postacrosòmica de manera que l'espermatozoide es pugui fusionar amb la membrana de l'òdit. Una altra interpretació seria que aquestes dues zones fossin potencialment fusogèniques, i que, per tant, haurien de ser preservades de la vesiculació per a poder donar la fusió amb l'òdit.

Hi ha diverses teories que expliquen els mecanismes pels quals té lloc la R.A. (Gordon i col., 1978; Green, 1978; Meizel, 1978; Davis, 1978). En una revisió més recent, Yanagimachi (1981) proposà una teoria que recull els aspectes més rellevants de totes elles juntament amb aportacions del mateix autor i que podem considerar de síntesi. Segons aquesta síntesi la R.A. es desenvoluparia de la forma següent:

. Els transportadors de Ca^{2+} de la membrana estarien inhibits i/o bloquejats per secrecions adquirides al llarg del trànsit pel tracte genital masculí (testiculars, epididimals i seminals). La capacitació no seria altra cosa que el procés d'eliminar-les, però deixant un últim bloquejador (més afí als transportadors) que només podria ser eliminat per l'acció d'agents específics de les cèl.lules de la línia germinal fe menina (cèl.lules fol·liculars i/o l'òdit).

. Un cop extrets els bloquejadors hi hauria una entrada en massa de Ca^{2+} al citoplasma (espai intermembranós) que tindria dos efectes diferenciats:

- D'una banda neutralitzaria les càrreges negatives que provoquen la repulsió de les dues membranes i alteraria l'estructura de mosaic fluid intercalant-s'hi i passant a ser cristal·lina. El primer afavoriria l'apropament entre ambdues membranes, la segona crearia zones d'energia lliure elevada que permetrien la fusió i vesiculació.

- D'altra banda el Ca^{2+} , ja sigui directament o mitjançant un augment del pH, activaria la fosfolipasa acrosòmica. Aquest enzim catalitza la hidròlisi dels fosfolípids a lisofosfolípids i àcids grassos. Els lisofosfolípids que quedarien intercalats en les membranes hi induirien perturbacions que facilitarien la fusió. Mestrestant, els àcids que inhibeixen l'acció de la fosfolipasa serien capturats i extrets de la membrana per acció de l'albumina sèrica o proteïnes afins del tracte genital femení.

. Altres autors han postulat que el Ca^{2+} tindria una acció d'activació de la proacrosina a acrosina, la qual actuaria, ja sigui dispersant la matriu acrosòmica (Fraser, 1983b), ja sigui digerint les proteïnes del citoesquelet de l'espai intermembranós que impedeixen l'apropament de les dues membranes (Clegg, 1983).

INDUCCIÓ DE LA R.A.

Sembla clar que la R.A. es regula gràcies a la capacitació. Ara bé, la seva inducció tant pot ser que sigui una conseqüència immediata de la capacitació i d'un nivell adequat de Ca^{2+} (Bedford, 1983) com que d'algun manera les cèl·lules de la línia germinal femenina la desencadenin.

La R.A. s'ha de donar en la proximitat de les cèl·lules de la línia germinal femenina, però el lloc exacte ha estat àmpliament debatut. Recentment Yanagimachi i Phillips (1984) han proposat un model en hámster derivat d'observacions in vivo que proposa dues estratègies:

. Quan hi hagués un cumulus compacte (in vivo) l'espermatozoide tindria la R.A. mentre el travessaria.

La R.A. formaria, aleshores, l'anomenat "fantasma acrosòmic" (acrosomal ghost), compost per la membrana plasmàtica i l'externa de l'acrosoma vesiculades i fusionades, unides per una capa de contingut acrosòmic.

Quan l'espermatozoide arribaria a la zona pel·lúcida (ZP) el seu cap s'hi mantindria unit per aquest fantasma. Aleshores l'espermatozoide penetraria la ZP, tot deixant-lo darrera.

Si el fantasma s'hagués perdut en passar pel cumulus, l'espermatozoide s'uniria a la ZP per la membrana interna de l'acrosoma i/o la membrana plasmàtica que recobreix el segment equatorial. Aleshores penetraria la zona.

. Si el cumulus ha estat totalment o parcialment desintegrat (per exemple per un excés de temps des de l'ovulació o en condicions in vitro per efecte d'altres espermatozoides podrien arribar a la ZP espermatozoides amb l'acrosoma intacte (Florman i Storey, 1982). Aquests sufrien la R.A. en la superfície de la zona i després la penetrarien.

1.1.1.5. La interacció amb les cobertes oocitàries-Penetració

1.1.1.5.A. Cumulus oophorus

La primera de les cobertes oocitàries que troben els espermatozoides durant la fecundació és el cumulus oophorus. El cumulus és el conjunt de les cèl·lules de la granulosa (fol·liculars) que queden adherides a l'òcit al moment de l'ovulació, unides entre si per l'àcid hialurònic (fig. 6).

Sembla que tindria la funció de facilitar el transport pel tracte genital femení durant l'ovulació ajudada pels cilis de l'epiteli de l'oviducte.

La penetració del cumulus dependrà d'on tingui lloc la R.A. Si considerem que aquesta té lloc durant el trànsit pel cumulus hi haurà tres enzims acrosòmics que estaran majoritàriament implicats en la dissolució de la matriu intercel·lular: la hialuronidasa (HSA), l'aril sulfatasa i la proteïnasa àcida.

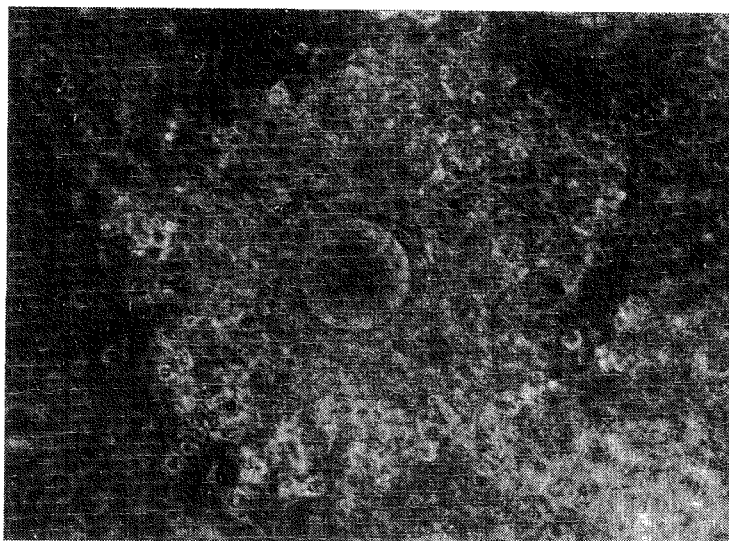


Fig. 6.- Imatge al microscopi invertit de contrast de fases d'un oòcit madur de ratolí envoltat de les cèl.lules fol.liculars que constitueixen el cumulus oophorus (Foto V. Català).

1.1.1.5.B. Zona pel·lúcida

Un cop travessat el cumulus l'espermatozoide es troba amb la ZP. La ZP és la coberta glucoproteica que envolta l'òcit (fig.2). Se li han atribuït diverses funcions importants:

- . Com barrera interespecífica i lloc de reconeixement dels espermatozoides de la pròpia espècie.
- . Com a factor actiu en la prevenció de la polispèrmia.
- . Per mantenir els blastòmers de l'embrió en un espai reduït i en estret contacte abans no es doni la compactació.
- . Per evitar la implantació de l'embrió en llocs inadequats (embarassos ectòpics), mantenint el blastòcit dins un embolcall elèctric i químicament neutre.

INTERACCIÓ ENTRE L'ESPERMATOZOIDE I LA ZP

Es desenrotlla en dues fases:

- . Un primer contacte i reconeixement de receptors d'ambdues superfícies a través d'una unió dèbil (zona attachment)
- . Una unió ferma (zona binding) que fa que a vegades els espermatozoides romanguin units a la zona fins a l'estadi de blastòcit (fig. 7).

Segons Florman i col. (1982) els receptors de membrana de l'espermatozoide tindrien una estructura semblant a la del lloc actiu de la tripsina (ja que inhibidors de la tripsina impedeixen la unió de l'espermatozoide amb la ZP), mentre el lloc d'unió de la ZP (ZP_3) seria semblant al substrat d'aquest enzim. Mitjançant la presència reguladora del Ca^{2+} que provocaria una conformació adequada en el receptor de l'espermatozoide, es produiria una primera interacció i el reconeixement entre ambdues superfícies (unió dèbil) seguida després de la formació d'un enllaç covalent entre les dues proteïnes (unió ferma). Segons l'autor aquest fet dispararia la R.A.

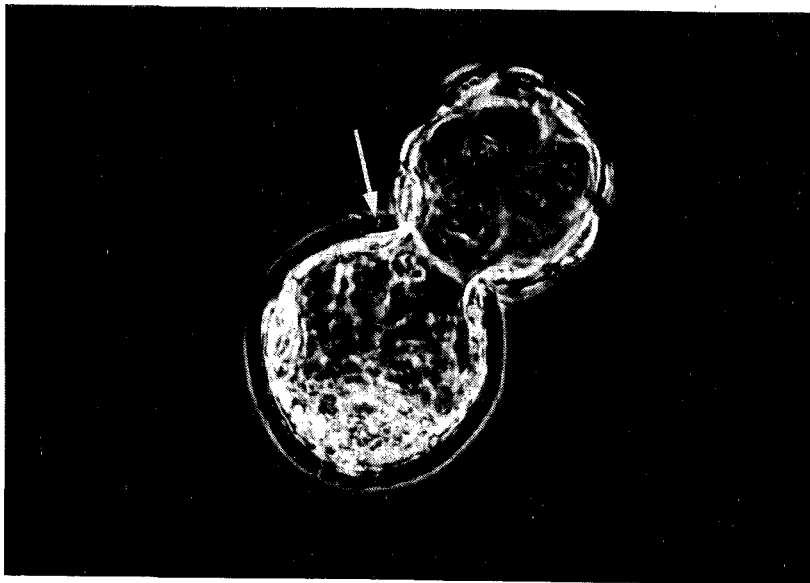


Fig. 7.- Embrions de ratolí a l'estadi d'eclosió del blastòcit de la zona pel·lúcida (després de cinc dies en cultiu) on s'aprecien espermatozoides units encara a la zona (fletxa) mercès el mecanisme d'unió ferma.

MECANISMES DE PENETRACIÓ DE LA ZP

Hi ha dues interpretacions per a explicar-la. En ambdós casos es considera imprescindible la R.A. prèvia.

. L'explicació clàssica considera que es faria per dissolució enzimàtica a través de l'acció de l'acrosina unida a la membrana acrosòmica interna i, ajudada per la β -N-hexosaminidasa i l'aril sulfatasa.

. Recentment Green i Purves (1984) han proposat que la penetració sigui per acció mecànica afavorida per la hiperactivació i que la R.A. seria necessària per a descobrir el "perforatori" (part anterior del citoplasma per sobre del nucli) (fig. 1)

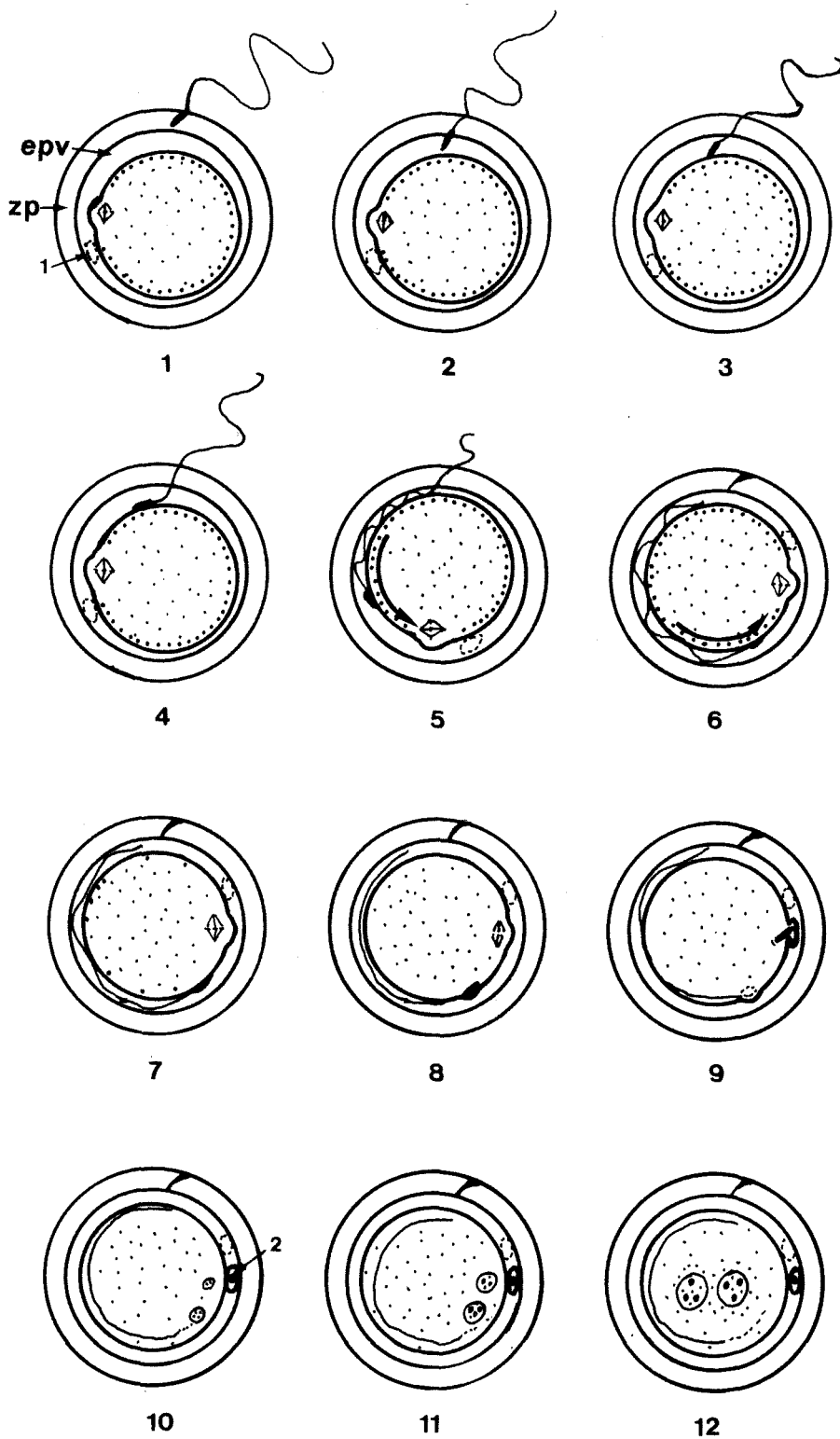
No es descarta tampoc la possibilitat de què ambdues interpretacions actuïn conjuntament.

La penetració de la ZP es realitza quasi obliquament. Quan tot el cap ha ultrapassat la zona contacta immediatament amb la superfície vitel·lilina. El primer lloc de contacte pot ser l'extrem del cap, però tot seguit s'ajeu horitzontalment sobre la membrana plasmàtica. La unió entre els dos gàmetes i el moviment vigorós de la cua fa girar l'òdit dins la ZP fins que tota o gairebé tota és dins l'espai periplasmàtic. De sobte els moviments de la cua disminueixen i es van fent esporàdics, fins que es realitza la fusió (fig. 8) (Yanagimachi, 1981).

1.1.1.6. La fusió

L'especificitat de la fusió és inferior a la de la unió amb la ZP (per això es poden produir fecundacions interespecífiques amb òdits lliures de la ZP) (Rudak, 1981).

La fusió de les membranes necessita la presència de Ca^{2+} que actua de forma semblant a com ho fa durant la vesiculació i la R.A. prèvia. Aquesta, com ja hem vist, produeix canvis a la membrana de l'espermatozoide per sobre del segment equatorial i la regió post-acrosòmica que és per on s'inicia aquest procés de fusió en l'espermatozoide. Quant a l'òdit



sembla que té lloc a través dels microvilli de la membrana plasmàtica, ja que la regió que no en té, per sobre la placa metafàsica de l'òcit, gairebé mai no és un lloc de fusió (fig. 9).

Un cop s'ha produït la fusió entre membranes, els microvilli i les projeccions citoplasmàtiques de l'òcit engloben el cap de l'espermatozoide completant la penetració dins el citoplasma (fig. 10). Mentre el nucli es va descondensant, la cua s'incorpora al vitel·lus totalment o parcialment (Gaddum-Rose i col., 1982) (fig. 8).

1.1.2. Fenòmens postzigòtics

1.1.2.1. Activació dels gàmetes

Com a resposta a l'estímul de la fusió i penetració de l'espermatozoide el zigot sofreix un seguit de canvis que es tradueixen en l'acabament de la meiosi femenina (extrusió del segon corpuscle polar), la reacció cortical (R.C.) i l'activació de tot el metabolisme fins aleshores gairebé inert.

1.1.2.1.A. Canvis iònics

Els canvis iònics durant la fertilització són poc coneguts en mamífers. Aquests canvis estan íntimament relacionats amb canvis de potencial de membrana derivats de la fertilització, el què s'anomena potencial de fertilització.

El potencial de fertilització consisteix en hiperpolaritzacions recurrents mediades per increments periòdics de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular (Igusa i Miyazaki, 1983). Aquests canvis periòdics els produiria l'emmagatzemament i alliberament cíclics del Ca^{2+} en receptacles (apoproteïnes) propers a la membrana plasmàtica juntament amb un increment de la permeabilitat del Ca^{2+} i K^+ (Miyazaki, 1983).



Fig. 9.- Microfotografia amb el microscopi electrònic de scanning que mostra un oòcit de ratolí sense zona pel·lúcida fecundat in vitro. S'observen les microvellositats de la membrana citoplasmàtica i la zona que no en presenta, sobre la placa metafàsica, lliure d'espermatozoides. La fletxa assenyala el cap d'un espermatozoide fusionat amb la membrana citoplasmàtica que ha iniciat la fecundació (Foto M. Ponsà).

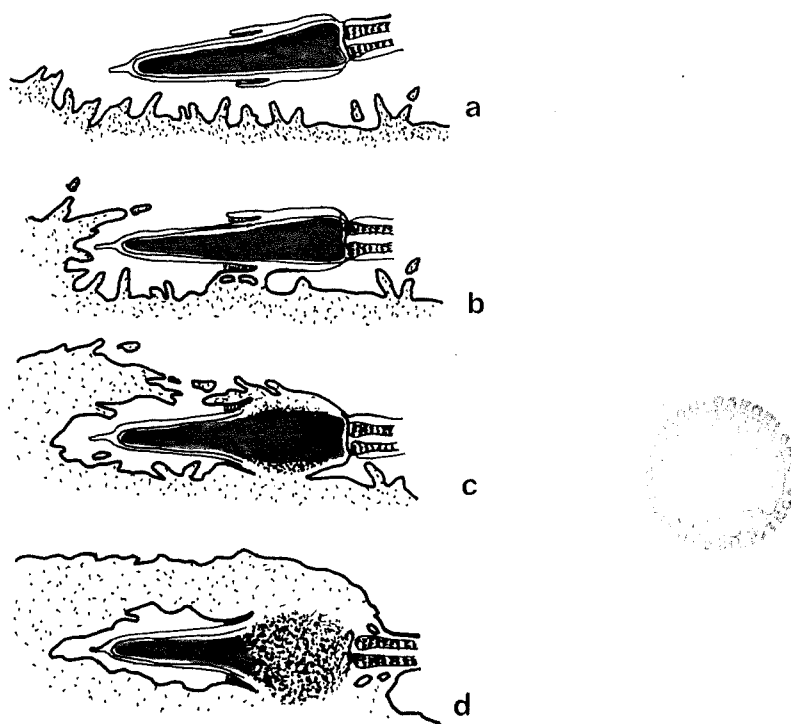


Fig. 10.- Esquema de la fusió del cap de l'espermatozoide amb la membra
na citoplasmàtica de l'oòcit (segons Moore i Bedford, 1983)

- a- l'espermatozoide, que ja ha sofert la R.A., s'apropa, horit
zontalment, a la superfície de l'oòcit
- b- la membrana plasmàtica que recobreix el segment equatorial
de l'espermatozoide fa el primer contacte amb els microvil·
lis de l'oòcit
- c- les microvellositats i projeccions citoplasmàtiques de
l'oòcit comencen a envoltar el cap de l'espermatozoide.
Simultàniament llur nucli inicia la descondensació
- d- el citoplasma de l'oòcit engloba totalment el cap de l'es-
permatozoide, mentre que el seu nucli segueix descondensant
se. El segment equatorial i la membrana interna de l'acro-
soma romanen intactes, sense fusionar-se, formant una mena
de vesícula a l'interior del citoplasma de l'oòcit.

El significat biològic d'aquestes hiperpolaritzacions és encara desconegut. Alguns autors han suggerit que podrien intervenir d'alguna manera en el blocatge de la polispèrmia, ja sigui directament a nivell de membrana o provocant la reacció cortical.

1.1.2.1.B. Reacció cortical (R.C.)

La R.C. és la fusió dels grànuls corticals (fig. 2) amb la membrana plasmàtica del zigot, la qual va acompanyada de l'alliberament del material dens que contenen els grànuls a l'espai perivitel·lí. Aquest material és considerat com els enzims responsables del blocatge de la polispèrmia que veurem tot seguit.

1.1.2.1.C. Blocatge de la polispèrmia

Té una gran importància car la polispèrmia és el mecanisme més freqüent de producció d'embrions poliploides.

Existeixen diversos factors que prevenen la polispèrmia en mamífers (Wolf, 1981):

RESPOSTA DE BLOCATGE DE L'OÒCIT PER SE

La resposta de blocatge de l'oòcit és el resultat immediat de la R.C. Pot ser diferenciada a dos nivells:

- . Reacció de la ZP (ZR): Es produeix per alteracions o emmascarament dels receptors de la ZP (Bedford, 1982) reduint així la unió i penetració d'altres espermatozoides.

Seria provocada per la R.C. que alliberaria proteases a l'espai periplasmàtic destruint les proteïnes receptores de la zona.

Necessita de 8 a 10 minuts per a estendre's a tot l'oòcit; sembla, doncs, que, a més, haurien d'actuar altres mecanismes més ràpids.

La ZR tindria un altre component: l'enduriment de la ZP (zona hardening)

a la dissolució per enzims proteolítics, dificultant d'aquesta manera l'acció de l'acrosina. Aquests canvis serien provocats per una ovoperoxidasa alliberada durant la R.C. Aquest enzim catalitzaria la formació de residus de ditirosina (tal com té lloc en l'eriçó de mar) augmentant la resistència a la degradació proteica.

. Bloatge a la membrana plasmàtica: En algunes espècies de mamífers es detecten durant la fecundació un gran nombre d'espermatozoides a l'espai periplasmàtic. Això s'ha interpretat com que aquests animals tindrien un bloatge a la polispèrmia a nivell de membrana mentre que els manca-ria a nivell de ZP.

Aquest tipus de bloatge podria no ser general per a tots els mamífers ja que hi hauria espècies (la de l'hàmsster) que no la presentarien, mentre que n'hi hauria d'altres que presentarien les dues (la del ratolí) (Jaffe i col., 1983).

El bloatge a nivell de membrana probablement es produeixi a través de canvis en les propietats físico-químiques de la membrana de l'oòcit. D'una banda, les alteracions en el potencial elèctric i la permeabilitat de membrana que afectarien la seva fluïdesa i el lliure moviment de les seves partícules i, de l'altra, la fusió de membranes de diferents orígens (vitel·lí, de l'espermatozoide i dels grànuls corticals) podrien estar involucrats en aquest mecanisme de prevenció de la polispèrmia.

RESTRICCIÓ DEL NOMBRE D'ESPERMATOZOIDES QUE ARRIBEN AL LLOC DE LA FECUNDACIÓ IN VIVO

Aquest fet disminueix la probabilitat de què dos espermatozoides interaccionin i penetrin l'oòcit simultàniament.

L'EFFECTE PROTECTOR DE LES CÈL·LULES FOL·LICULARS

Es considera que el cumulus oophorus i corona radiata retarden la penetració dels espermatozoides.

L'ELIMINACIÓ D'ESPERMATOZOIDES SUPERNUMERARIS

S'ha detectat l'eliminació d'espermatozoides supernumeraris del citoplasma

ma de l'òocit, englobant-los en extrusions citoplasmàtiques (Yu i Wolf, 1981).

1.1.2.2. Formació de pro-nuclis

El pas següent a la fusió és la formació dels pro-nuclis masculí i femení, seguida de la seva migració i de la formació de la placa metafàsica de la primera divisió embrionària.

SEQÜÈNCIA DE FORMACIÓ DEL PRO-NUCLI MASCULÍ

- . Trencament de la membrana nuclear de l'espermatozoide.

- . Descondensació de la cromatina per reducció dels ponts de disulfur entre protamines.

Aquesta descondensació ha d'ésser mediada per un factor, el SNDF (Sperm Nucleus Decondensation Factor) d'origen femení que apareix en l'òocit després del trencament de la vesícula germinal. Aquest factor només induiria la descondensació del nucli de l'espermatozoide ja que el posterior desenvolupament del pro-nucli masculí necessita la presència d'un altre factor, el SPDF (Sperm Pronucleus Development Factor) (Yanagimachi, 1981).

- . Desaparició de les proteïnes tipus protamina.

- . Formació de la membrana pro-nuclear.

- . Aparició de la síntesi de DNA i d'histones (de 5 a 8 hores després de la fusió).

FORMACIÓ DEL PRO-NUCLI FEMENÍ (Sato i Blandau, 1979)

Simultàniament es produeix l'acabament de la meiosi per part de l'òocit i la consegüent extrusió del segon corpuscle polar (fig. 11):

- . Les cromàtides comencen a moure's cap els pols del fus acromàtic fins que s'acaba l'anafase II.

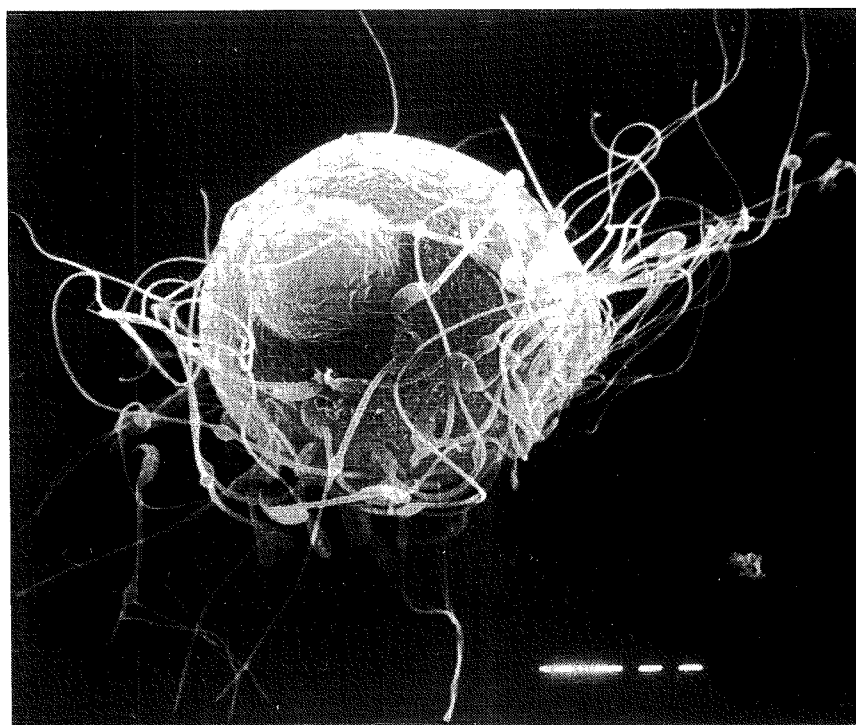


Fig. 11.- Microfotografia al microscopi electrònic de scanning que mostra l'extrusió del segon corpuscle polar després de la fecundació. El corpuscle polar, la protusió al centre del zigot, surt del citoplasma per la zona lliure de microvil·lis que recobria la placa metafàsica de l'òcit. (Foto M. Ponsà).

. S'inicia el solc de divisió fins que toca les fibres del fus i divideix la protusió citoplasmàtica per la meitat.

. S'absorbeix una meitat de la protusió mentre el fus gira aproximadament 90° posant-se gairebé perpendicular a la superfície del zigot.

. El solc segueix avançant i es produeix l'extrusió del segon corpuscle polar (fig. 12).

. Les cromàtides femenines es descondensen i s'envolten d'una membrana per formar el pro-nucli femení (més petit que el masculí) (fig. 13).

1.1.2.3. Primera divisió embrionaria

Els dos pro-nuclis migren cap al centre del zigot ajudats pel sistema microtubular de l'oòcit, on es poden afegir els microtúbuls i l'actina de l'axonema de l'espermatozoide.

Un cop són al centre comença la primera profase a cadascun dels pro-nuclis, condensant-se els cromosomes i desapareixent l'embolcall nuclear (fig. 14), Després els dos complements cromosòmics se situen en la mateixa placa metafàsica, produint-se la singàmia. Posteriorment es donarà l'anafase i la telofase amb la consegüent primera divisió embrionaria (fig. 15).

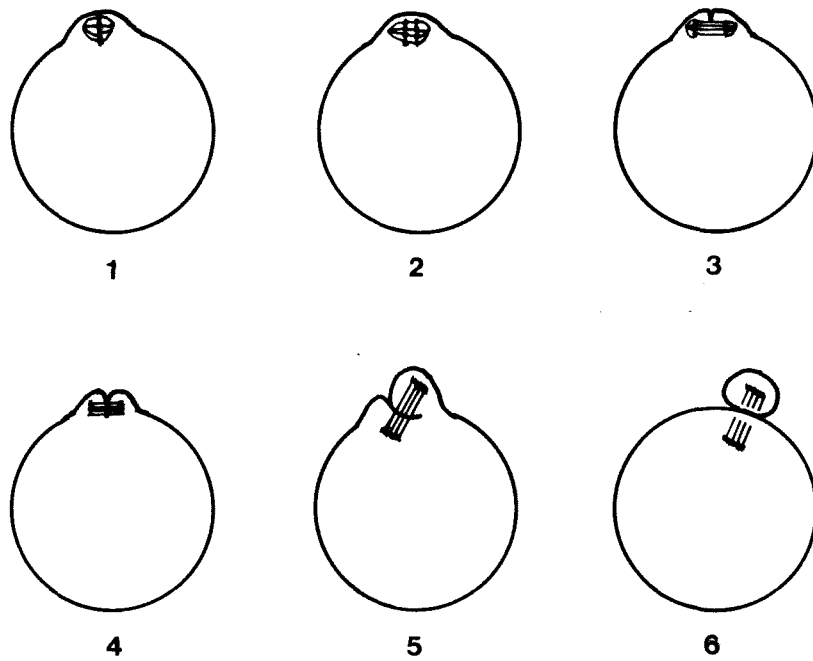


Fig. 12.- Esquema representatiu de la seqüència de l'extrusió del segon corpuscle polar en ratolí (segons Sato i Blandau, 1979) on es veu el gir de gairebé 90° que realitza el fus acromàtic.

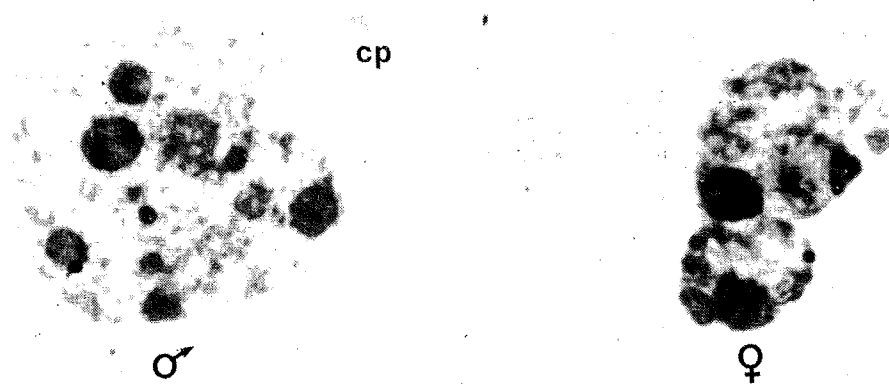


Fig. 13.- Aspecte dels dos pro-nuclis d'un zigot tal com apareixen després d'haver-ne eliminat el citoplasma. El pro-nucli femení, més petit, ha perdut la seva forma circular per efecte de la fixació (cp: corpuscle polar).

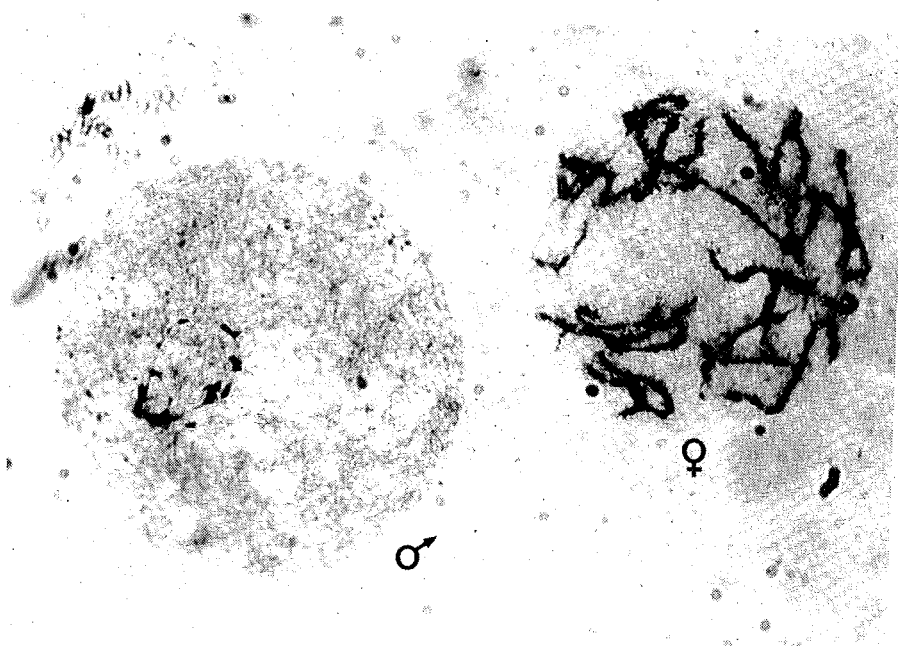


Fig. 14.- Pro-nuclis masculí i femení del zigot de ratolí. El pro-nucli femení ha iniciat la condensació de la cromatina en forma de cromosomes (profase) mentre que el masculí, sempre més endarrerit, roman encara amb aspecte d'interfàsic.

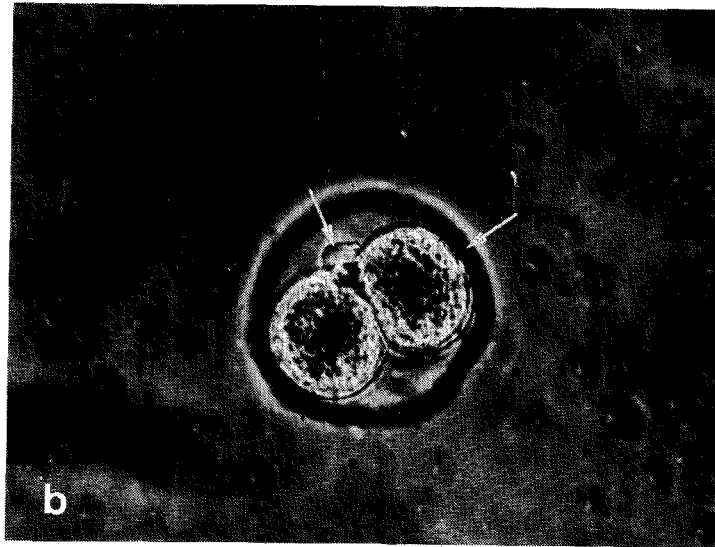
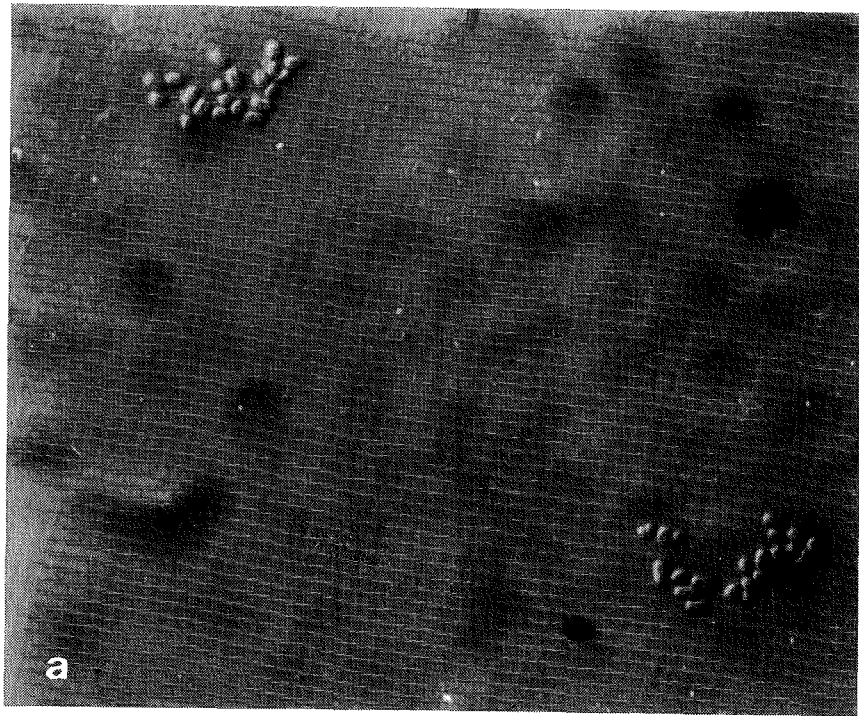


Fig. 15.- a- Aspecte dels cromosomes metafàsics de la primera divisió embrionària de ratolí abans de la singàmia, tal com apareix al microscopi amb contrast interferencial de Nomarski.

b- Imatge d'un embrió a l'estadi de dues cèl.lules, després de la primera divisió embrionària, al microscopi invertit de contrast de fases (zp: zona pel.lúcida, cp: segon corpuscle polar).

1.2. Problemàtica reproductiva a l'espècie humana

L'espècie humana sembla ser una de les espècies de mamífers que presenta un major índex de problemes reproductius (Bond i Chandley, 1983).

Deixant de banda les alteracions que impliquen errors en els processos que intervenen en la pròpia fecundació, les anomalies cromosòmiques representen un percentatge força elevat entre les causes d'infertilitat humana, a través de la mort fetal i la consegüent inducció d'avortaments espontanis.

Mentre que la freqüència total d'anomalies cromosòmiques entre els nascuts vius s'ha fixat al voltant d'un 0.7% (Mattei i col., 1981) en general s'accepta que aquesta incidència ha d'ésser molt més elevada al moment de la concepció.

Considerant la dificultat de detectar embarassos els períodes pre i peri-implantacionals (primeres setmanes de gestació) i utilitzant mètodes de detecció precoç (β -HCG en orina) s'ha estimat que un 30% de les concepcions avorten abans de la primera falta, mentre que del 68% restant només n'arriben a terme un 85% (58% del total) (Rudak, 1981).

D'aquest 10% d'avortaments en estadis postimplantacionals, Boué i col. (1975) va estimar que aproximadament un 65% presentaven una etiologia cromosòmica que estaria distribuïda de la següent manera (Bond i Chandley, 1983): 70% d'aneuploïdies (fonamentalment trisomies autosòmiques i XO), 17% de triploïdies i de la resta, un 60% que inclouria anomalies estructurals, mosaics, hiperploïdies de cromosomes sexuals i monosomies autosòmiques.

Cal tenir en compte que aquestes dades tampoc no signifiquen el nombre de zigots cromosòmicament anòmals ja que les alteracions poden ser més freqüents en avortaments primerencs, previs al reconeixement de la gestació. Entre aquestes alteracions severes, incompatibles amb la vida embrionaria hi figurarien majoritàriament algunes trisomies i la gran majoria de monosomies autosòmiques, tal com succeeix en el cas del ratolí (Gropp i col, 1974).

Per aquesta raó les estimacions de la incidència primària d'aparició d'anomalies cromosòmiques en l'home abasten un ampli ventall que va des d'un 8-10% (Kajii i col., 1978) fins a un 50% (Boué i col., 1975).

1.3. Origen de les anomalies cromosòmiques

Les anomalies que afecten els cromosomes poden classificar-se en dos grans tipus: estructurals i numèriques.

Les anomalies de tipus estructural es produeixen en reparar-se anormalment els trencaments cromosòmics que tenen lloc de forma espontània. Les més freqüents són translocacions, delecions i inversions.

Les anomalies numèriques es produeixen com a conseqüència d'errors en el repartiment (segregació) dels cromosomes durant la divisió cel·lular. Són fonamentalment poliploïdes i aneuploïdies.

1.3.1. Origen de les anomalies estructurals

CAUSES DE TRENCAMENT CROMOSÒMIC

En qualsevol tipus de cèl·lula es detecta una freqüència d'aparició espontània de trencaments cromosòmics.

Independentment d'aquesta incidència hi ha nombrosos agents, tant físics com químics, que augmenten el nombre de trencaments observats i que reben el nom genèric d'agents clastògens (productors de trencaments).

Aquests trencaments poden tenir lloc abans de la replicació del DNA de manera que apareixen en ambdues cromàtides, donant una alteració de tipus cromosoma. Per contra, si tenen lloc després de la replicació del DNA, donen alteracions de tipus cromàtide.

DELECCIONS

Són a causa de la pèrdua d'una porció del cromosoma la qual quedarà com un fragment acèntric.

Aquesta pèrdua pot produir-se per un sol trencament (delecció terminal), per dos trencaments (delecció intersticial) o per una doble delecció terminal amb formació d'un cromosoma en anell (fig. 16).

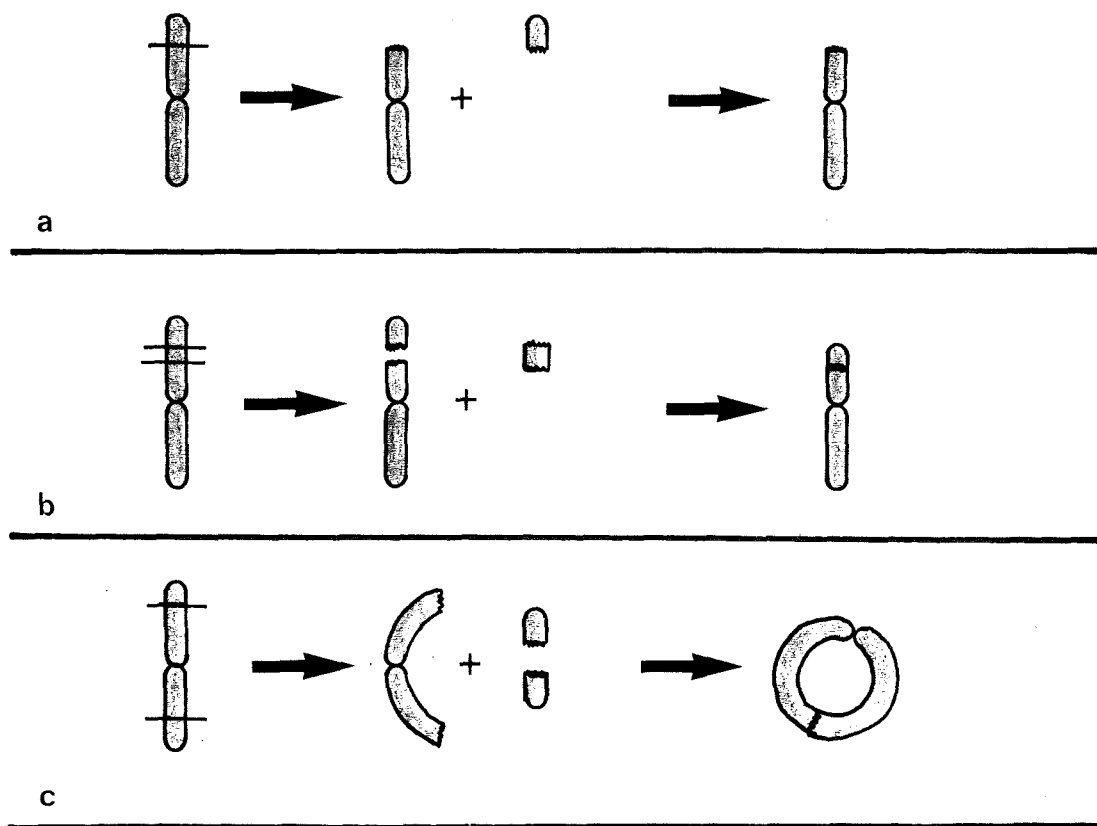


Fig. 16.- Esquema representatiu de la formació de les delecions cromosòmiques.

a- deleción terminal

b- deleción intersticial

c- formació d'un cromosoma en anell

INVERSIONS

Són el resultat de dos trencaments amb intercanvi dels fragments que dó na un gir de 180° aparent del fragment intermedi. Poden ser pericèntriques (que inclouen el centròmer) o paracèntriques (que tenen lloc fora de la regió centromèrica) (fig. 17)

TRANSLOCACIONS

Es produeixen com a resultat de dos o tres trencaments cromosòmics seguits del desplaçament d'un fragment, ja sigui dins del mateix cromosoma (translocació intracromosòmica, també anomenada inserció) o a un cro mosoma diferent (translocació intercromosòmica). Entre aquestes darreres les més comuns són les anomenades translocacions robertsonianes o fusions cèntriques, les translocacions recíproques i les insercions intercromosòmiques.

Les fusions cèntriques provenen de la fusió de dos cromosomes (fig. 18) mentre que les translocacions recíproques són l'intercanvi de fragments entre cromosomes diferents (fig. 19)

1.3.2. Origen de les anomalies numèriques

POLIPLOÏDIES

Poden sorgir tant per duplicacions del material genètic sense la consegüent divisió cel.lular, o bé, majoritàriament, d'errors en el moment de la fecundació.

Els més freqüents entre els poliploides són els triploides, l'origen dels quals pot ser a través de tres mecanismes:

- . Fecundació d'un oòcit normal per dos espermatozoides normals (dis pèrmia).

- . Fecundació d'un oòcit normal per un espermatozoide diploide.

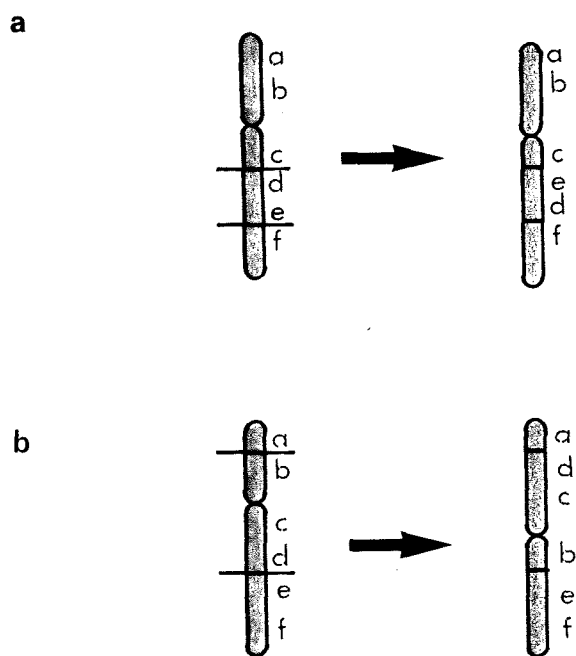


Fig. 17.- Esquema d'inversions cromosòmiques.

a- paracèntrica

b- pericèntrica

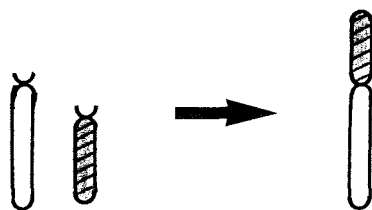


Fig. 18.- Translocació robertsoniana o fusió cèntrica. Generalment implica dos cromosomes acrocèntrics per formar-ne un de metacèntric.

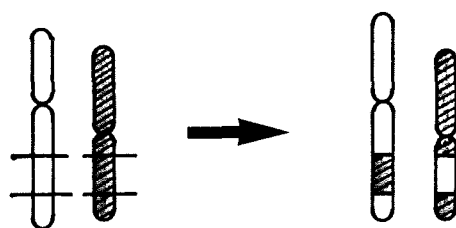


Fig. 19.- Esquema d'una translocació recíproca entre dos cromosomes metacèntrics.

. Fecundació d'un oòcit diploide, produït per la no extrusió del segon corpuscle polar, per un espermatozoide normal.

La resta de poliploides (tetraploides, pentaploides, etc.) s'originen per combinacions d'aquests tres mecanismes.

ANEUPLOÏDIES

Inclouen les hiperploïdies, d'entre les quals la trisomia és la més freqüent, i les hipoploïdies, la més important de les quals és la monosomia.

Els mecanismes de producció de les aneuploïdies es poden classificar en: no congregació (asinapsi) i discongregació (desinapsi), pèrdua cromosòmica, replicació extra i no disjunció (Bond i Chandley, 1983) (fig. 20).

. Asinapsi i desinapsi: Representen anomalies en l'aparellament (sinapsi) dels cromosomes homòlegs durant la meiosi. Mentre que en l'asinapsi els homòlegs no s'aparellen o ho fan de forma incompleta en zigotè, en la desinapsi sí que s'aparellen però se separen precoçment.

. Pèrdua cromosòmica (anafàsica): És un mecanisme de producció de monosomies. Un o diversos cromosomes s'endarrereixen durant l'anafase i no arriben al pol corresponent, per la qual cosa es perden. Dóna lloc a la formació de micronuclis i nuclis amb menys cromosomes en la interfase.

. Replicació extra: Hi ha la possibilitat que sorgeixi un error en la replicació cromosòmica, de manera que aparegui una còpia extra d'un cromosoma, la qual cosa produiria l'aparició d'una hiperploïdia en una de les cèl.lules filles obtingudes.

. No disjunció: És la conseqüència dels fenòmens que donen lloc a l'aparició de les aneuploïdies. Es produeix per la migració a un mateix pol de les dues cromàtides d'un cromosoma (en Mitosi i Meiosi II) dels dos cromosomes d'un bivalent (Meiosi I) o per segregació 3:1 d'una translocació robertsoniana o d'un quadriradial de translocació recíproca. El resultat és que una cèl.lula filla guanya un cromosoma (hiperploïdia) i l'altra el perd (hipoploïdia). S'ha suggerit que aquest comportament anòmal podria ser produït per l'entortolliment dels homòlegs o bé per la mala orientació dels cromosomes en els microtúbuls del fus.

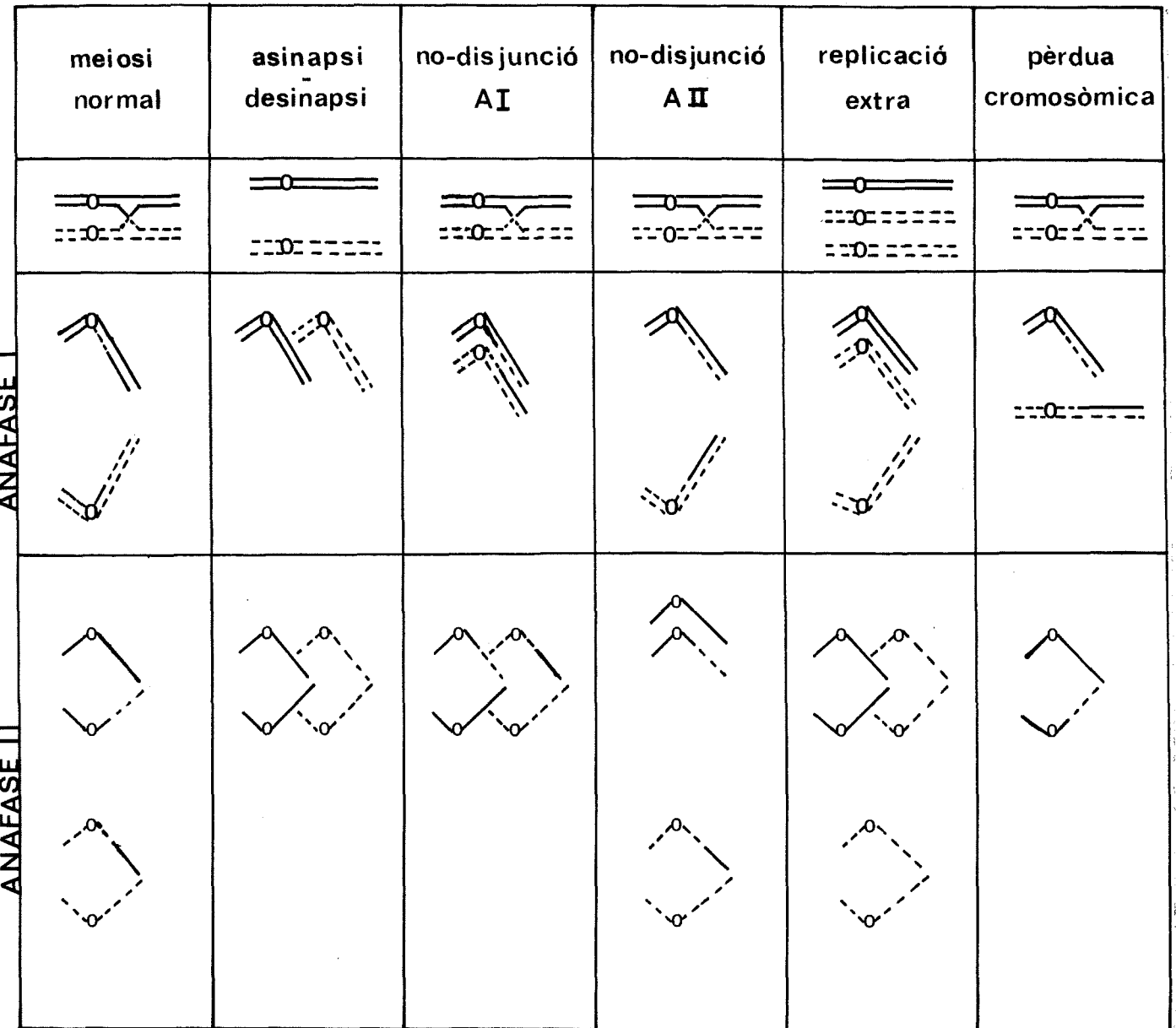


Fig. 20.- Esquema general dels mecanismes de producció d'aneuploïdies. Tant l'asinapsi com la desinapsi, malgrat ser diferents, tenen efectes idèntics. Observi's que la no-disjunció pot tenir lloc tant en la primera com en la segona divisió meiótica.

El tipus cel.lular en el que té lloc l'aparició d'aquestes anomalies influeix en el resultat obtingut. Així en cèl.lules somàtiques que sofreixen processos mitòtics donen com a resultat l'aparició de mosaics cel.lulars dins l'organisme. En cèl.lules de la línia germinal aquest fenomen produirà gàmetes desequilibrats que es traduiran en la disminució de la fertilitat de l'individu i en la concepció d'embrions cromosòmicament anòmals.

1.4. Estudi de les alteracions cromosòmiques

Ja hem esmentat la importància de les anomalies cromosòmiques en l'espècie humana de la qual es deriva l'interès de l'estudi de les característiques genètiques dels seus gàmetes, però cal tenir en compte la dificultat d'obtenir una anàlisi directa del nombre de gàmetes anòmals en l'home.

En el cas del mascle, la incidència d'aparició primària podria ser determinada mitjançant estudis de meiosi (en biopsia testicular i semen) i de complexos sinaptonèmics (Templado i col., 1976, 1978; Vidal i col., 1982) donada la relativa facilitat d'obtenció de les mostres. Darrerament s'ha dut a terme, en una mostra petita, una anàlisi directa de la dotació cromosòmica d'espermatozoides humans mitjançant la tècnica de fecundació heteròloga entre espermatozoides humans i oòcits d'hàmsster sense zona pel·lúcida (reactivació d'espermatozoides) (Rudak i col., 1981) obtenint-se un 5.2% d'aneuploïdies i un 3.4% d'anomalies estructurals i trencaments (Martín i co., 1982).

En la dona, en canvi, les dificultats d'obtenció d'un nombre elevat d'oòcits per la seva anàlisi han limitat extraordinàriament aquest tipus d'estudis.

Angell i col. (1983) va pensar en els avantatges que representaria l'estudi de la primera divisió embrionària per a solventar aquest problema d'analitzar embrions humans resultants de fecundacions in vitro (FIV), ja que obtenir-ne de fecundats in vivo representa una dificultat extraordinària gairebé insalvable.

Les consideracions ètiques i les dificultats tècniques que aquests estudis representaven feren que la mostra fos molt petita i, per tant, poc significativa (Angell obtingué quatre embrions anòmals d'un total d'onze analitzats).

Malgrat el gran interès d'aquests estudis cal fer certes consideracions de tipus metodològic pel que fa als resultats:

. En primer lloc, i tal com va apuntar Edwards (1983), els embrions

analitzats ho foren perquè no havien de ser reimplantats i, per tant, quan es triaren els embrions que presentaven aspectes més defectuosos, la mostra no era uniforme.

. En segon lloc no està en absolut clar que la FIV no representi una font extra d'anomalies cromosòmiques.

1.5. Utilització d'un model animal

Els inconvenients d'efectuar una anàlisi citogenètica com la que hem esmentat en l'espècie humana, ja sigui per raons ètiques ja sigui per les dificultats d'obtenir un nombre suficientment elevat d'embrions, sobretot en el cas dels fecundats in vivo, obliga a plantejar-se la utilització d'un model animal que permeti una experimentació sense limitacions d'aquesta classe.

Un dels models animals més utilitzats en els estudis genètics amb mamífers ha estat, sens dubte, el ratolí (Epstein, 1981), fonamentalment per estar ben caracteritzat genèticament dins d'una àmplia varietat de soques homogènies amb característiques genètiques diferenciades, i també per ser generalment emprat, la qual cosa facilita extraordinàriament les comparacions entre diferents autors i dissenys experimentals.

En aquesta espècie s'ha desenvolupat un mètode d'anàlisi de la primera divisió embrionària (Fraser i Maudlin, 1979) que consisteix en el cultiu dels zigots recent fecundats en un medi que contingui un antimitòtic (sulfat de vinblastina), el qual aturarà la migració dels pro-nuclis masculí i femení abans no es doni la singàmia. D'aquesta manera els complements cromosòmics d'origen patern i matern romandran separats i fàcilment distingibles per llur grau de condensació (els cromosomes materns estan més condensats i es presenten generalment més dispersos que els paterns) (fig. 21).

Aquest fet permetrà l'estudi de la freqüència primària d'aparició de les anomalies en cadascun dels gàmetes i en el moment de la fecundació.



Fig. 21.- Cromosomes de la primera metafase mitòtica de l'embrió de ratolí abans de la singàmia tenyits amb bandes G i C. Els complements d'origen patern i matern es distingeixen per llur respectiu grau de condensació cromosòmica.

1.6. La FIV com a possible font d'anomalies cromosòmiques

La utilització del model del ratolí ha permès analitzar la possibilitat que apuntàvem anteriorment, de què la FIV sigui, en si, una font extra d'anomalies cromosòmiques.

A desgrat que actualment hi hagi més de 1.000 éssers humans fecundats per aquesta tècnica a tot el món i encara que només un d'ells hagi presentat una anomalia de tipus cromosòmic (concretament una trisomia 21), caldria esbrinar si, en realitat, el risc d'aparició espontània d'una d'elles no es veu significativament incrementada pel fet de prescindir del tracte genital femení en el moment de la concepció. Si això fos cert podria explicar, almenys en part, la baixa taxa d'implantació i naixement a terme que s'obté fins i tot en els equips amb més experiència en aquest camp (al voltant d'un 15-20%).

El model animal ens permetrà, doncs, un nombre suficientment elevat d'embrions fecundats tant in vivo com in vitro de manera que les comparacions entre els nivells d'anomalies cromosòmiques sorgides espontàniament en ambdues poblacions tinguin un valor estadísticament significatiu.

1.7. Estudi de mutàgens

El model animal permet també efectuar estudis paral·lels a aquests aprofitant el desenvolupament de la tècnica d'estudis citogenètics en la primera divisió embrionària, per a aplicar-la al camp de l'estudi de la capacitat mutagènica de certes substàncies.

L'estudi de la inducció d'anomalies en el material genètic ha estat abordat des d'un gran nombre de tècniques que abasten des dels tests bacterians fins a l'estudi de cèl·lules de mamífer tant in vivo com in vitro.

Els tests bacterians són ràpids i d'elevat poder de detecció, però suposen un risc d'interpretació a l'hora d'extrapolar resultats. El metabolisme i l'estructura del material genètic bacterians són enormement diferents dels dels mamífers i, per tant, els efectes dels agents no tenen perquè ésser equiparables en ambdós casos.

Per evitar això s'han desenvolupat altres mètodes que aprofiten la capacitat d'induir trencaments i aberracions cromosòmiques (clastogenicitat) de certes substàncies, considerant-la com a indicadora de la capacitat mutagènica de qualsevol agent, químic o físic. Això implica que qualsevol agent que pugui induir una aberració cromosòmica comportarà un risc genètic de relativa magnitud.

Els sistemes més comuns de detecció de l'activitat clastogènica (amb medul·la òssia, intercanvi de cromàtides germanes, etc.) empen cèl·lules somàtiques i, per tant, només poden detectar danys causats en aquestes cèl·lules.

Cal tenir en compte que el dany causat a les cèl·lules somàtiques afectarà només al individu que hagi sofert l'exposició a l'agent, mentre que el dany a les cèl·lules germinals es trametrà en major o menor quantia a la descendència. En aquest darrer cas cal considerar, si el que estem utilitzant són test efectuats amb cèl·lules somàtiques, la diferent sensibilitat dels gàmetes als mutàgens derivada de les diferències entre els processos meiótics i mitòtics, de la menor eficàcia de reparació del DNA en les cèl·lules germinals comparada amb les somàtiques (per exemple, les limfòcits humans) (Adler i Grant Brewen, 1982) i de l'especificitat d'acció d'alguns agents per les cèl·lules sexuals

(Röhrborn i col., 1977).

En aquests casos en què la transmissibilitat de l'efecte és el més important s'han desenvolupat una sèrie de tests en què s'aprofita l'acció clastogènica dels mutàgens directament sobre les cèl.lules germinals o bé sobre els embrions resultants de l'encreuament d'individus tractats (translocació heredable i letals dominants).

Paral·lelament s'han desenvolupat altres proves que estudien els embrions abans que la forta selecció contra els anòmals actuï eliminant-los, reduint, al mateix temps, els efectes materns indirectes al mínim (Pedersen i Goldstein, 1979).

Aquests estudis es duen a terme en els estadis previs a la implantació, al voltant de la qual és més intensa la selecció (Hansmann i Röhrborn, 1973), i fonamentalment en la primera divisió embrionària.

Efectivament el mètode d'estudi de la primera divisió zigòtica, tal com l'hem descrit prèviament, permet la detecció tan d'anomalies numèriques com estructurals, ja siguin derivades del tractament de la línia germinal masculina com femenina, així com l'efecte d'aquest tractament sobre les característiques dels embrions obtinguts.

La possibilitat de tractar els mascles ha estat àmpliament utilitzada amb diferents mutàgens (etil-metano sulfonat, metil-metano sulfonat, trietilen melamina) per diversos autors (Tanaka i col., 1981; Albanese, 1982; Tease, 1982) a base de tractar l'animal i esperar el temps necessari perquè, coneixent la durada de l'espermatogènesi, es recullin els productes de les distintes fases afectades en forma d'espermatozoides portadors d'anomalies.

Altres autors en canvi (Röhrborn i Hansmann, 1971; Basler i col., 1976; Röhrborn i col., 1977; Hansmann, 1979) han efectuat l'estudi observant l'efecte sobre la meiosi de femelles tractades a diferents temps després de la inducció de l'ovulació per efecte de la HCG.

Aquest plantejament millora considerablement quan, seguint el mateix procediment s'estudia la primera divisió embrionària, fonamentalment perquè l'anàlisi dels cromosomes en aquest estadi és molt més precisa que no pas en les fases meiótiques.

Molt pocs autors l'han seguida (Hansmann i Röhrborn, 1973; Brewen i Payne, 1976, 1978; Hansmann, 1979; Tanaka, 1981) malgrat alguns avantatges considerables en determinats casos.

AVANTATGES

. En primer lloc és més ràpid, perquè no cal esperar gaires dies per obtenir els resultats com en el cas dels mascles, sinó que al cap de 12 hores (temps de l'ovulació) ja es poden produir els embrions afectats.

. És útil per als mutàgens de vida mitjana d'acció curta perquè es poden injectar immediatament abans de cada estadi que es vulgui afectar.

. La totalitat dels oòcits obtinguts hauran estat afectats en la mateixa fase, ja que la maduració és gairebé sincrònica. En el cas dels espermatozoides es poden produir efectes d'emmagatzemament (storage effect) que emmascararien els resultats (Albanese, 1982). Aquest efecte ha estat caracteritzat com una amplificació de les anomalies cromosòmiques estructurals com a funció de l'interval de temps entre el tractament i l'observació del dany en cèl.lules no proliferes. El temps relativament llarg entre l'efecte del mutagen i l'observació de la primera divisió zigòtica tractant el mascle (uns dies) queda reduït a unes hores quan es tracta de la femella.

D'altra banda el nombre de gàmetes estudiats representa, en el cas de la femella, un percentatge molt superior del total que no pas en el cas del mascle. Tractant la femella es poden analitzar, per exemple, 25 d'un total de 40 oòcits ovulats per femella, la qual cosa representa un 62.5% mentre que en el mascle se n'estudiaran, en el mateix cas, 25 d'un total aproximat de $1-3 \times 10^8$ espermatozoides per mascle, que significa un 2.5×10^{-5} %.

. Pot ser molt útil en casos en que es vulguin estudiar substàncies molt concretes que afectin només el sexe femení (per exemple, anticonceptius, hormones femenines, etc.) els seus resultats seran altament significatius (Röhrborn i col., 1977).

Malgrat tot també hi ha desavantatges en la utilització del sexe femení seguint aquest esquema experimental.

DESAVANTATGES

. No es pot estudiar l'efecte dels agents sobre la primera profase meiòtica, abans de dictiotè, perquè aquesta té lloc durant la vida fetal de la femella, mentre que l'espermatogènesi es desenvolupa íntegrament en l'adult.

. Sembla que els oòcits presenten una capacitat de reparació del DNA (Generoso i col., 1979; Adler i Grant Brewen, 1982) que eliminaria algunes lesions induïdes pel mutagen. Malgrat això aquesta capacitat segurament no pot eliminar els efectes dràstics que comporta un dany macroscòpic observable com el que es tracta de detectar.

1.8. Objectius i justificació del treball

El treball que presentem en aquesta Tesi Doctoral es justifica per l'interès d'avaluar la incidència de les anomalies cromosòmiques en el moment de la concepció en els mamífers. Aquesta incidència, tal com es veurà en l'apartat 4.3.1., creiem que és elevada entre els mamífers, en general, i molt sobretot creiem que ho és en l'espècie humana.

Per altra banda, s'ha pretès esbrinar els efectes de la FIV, cada cop més estesa en el tractament de certs problemes d'infertilitat humana, sobre la constitució cromosòmica dels embrions que se'n deriven. Aquesta anàlisi de l'aparició espontània d'anomalies cromosòmiques tant in vivo com in vitro s'ha determinat fent l'estudi de la primera divisió embrionària i emprant el ratolí com a model animal.

Així mateix hem considerat interessant comprovar la utilització dels mètodes desenvolupats com a possible test de mutagènesi per a determinades substàncies, ja que en la primera divisió embrionària es reflexa la constitució cromosòmica dels gàmetes masculí i femení per separat, de manera que queda patent l'efecte genotòxic que se'ls hagi pogut causar durant la gametogènesi.

L'enfocament d'aquest treball s'ha concretat en la consecució de tres objectius bàsics o etapes, que són els següents:

- . Aconseguir el desenvolupament de la tècnica de FIV en ratolins, tècnica que és bàsica en nombrosos estudis del camp de la biologia de la reproducció.

- . Estudiar l'efecte de la FIV en l'aparició d'anomalies cromosòmiques mitjançant la comparació de la primera divisió d'embrions fecundats in vivo i in vitro.

- . Utilitzar els estudis en la primera divisió embrionària com a test de mutagènesi, emprant la població de l'objectiu anterior com a control.

2. MATERIAL I MÈTODES.

2.1. Fonaments de les tècniques de fertilització *in vitro* i cultiu d'embrions pre-implantacionals

2.1.1. Desenvolupament i característiques dels medis de cultiu

Els medis de cultiu són l'ambient que envolta els gàmetes durant els processos de la fecundació i del desenvolupament del zigot *in vitro*; per tant, la seva composició i les seves característiques físiques hauran de mimetitzar al màxim l'ambient de l'oviducte que és on té lloc la fertilització i la vida pre-implantacional de l'embrió *in vivo*.

Malgrat això, i a causa de les dificultats que comporta l'estudi del fluïd de l'oviducte al moment de la fecundació, els medis no han estat desenvolupats tenint en compte aquest microambient, sinó més aviat ho han estat prenent solucions fisiològiques clàssiques i modificant-les fins a aconseguir que suportin la fecundació i el desenvolupament embriò nari.

Efectivament, si descartem els medis complexos com ara el TC 199 o el Ham's F₁₀ utilitzats en la FIV de certes espècies, la majoria de medis emprats actualment deriven, o bé de la solució de Krebs-Ringer bicarbonatada per a bany d'òrgans, o bé de la de Tyrode per a suplir els líquids extracel·lulars. Ambdues solucions s'assemblen més a la composició iònica del plasma sanguini que no pas a la de l'oviducte, però tot i així han servit per al desenvolupament posterior dels medis.

Passem ara a analitzar les característiques dels medis emprats, separant el de fertilització-capacitació, per una banda, i els de creixement-manipulació d'embrions, per l'altra.

2.1.1.1. Medi de capacitació-fertilització: T₆

Ha estat desenvolupat per Quinn i col. (1982) a partir de la solució de Tyrode.

COMPOSICIÓ

	mM
NaCl	97.86
KCl	1.42
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.78
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.47
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.36
NaHCO ₃	25.01
Glucosa	5.55
Piruvat sòdic	0.47
Lactat sòdic	24.93
BSA (F V)	15 mg/ml
Penicil.lina G sòdica	10 ⁵ ui
Estreptomina sulfat	0.05 mg/ml
Roig fenol	0.01 mg/ml

AIGUA

El component bàsic del medi és l'aigua, la puresa de la qual influencia molt l'èxit de l'experiment.

Normalment s'utilitza aigua tridestil.lada amb una resistència elèctrica superior a 12 M ohms per tal d'eliminar contaminants i ions indesitjables i assegurar una composició ben definida del medi.

SALS IÒNIQUES

Els ions que es troben al medi són fonamentalment el Na⁺, K⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, PO₄³⁻, HCO₃⁻.

Tots ells proporcionen al medi la pressió osmòtica necessària per a fer-lo isotònic amb les cèl.lules. Aquest paper el juga majoritàriament el ClNa, de manera que quan es vol canviar la força iònica es recorre a canvis en la concentració d'aquesta sal.

. El HCO₃⁻ actua com a tampó mantenint el pH estable a 7.4 a través de l'equilibri amb l'atmosfera al 5% de CO₂ en aire de l'incubador (de la qual parlarem més endavant). A més a més, estimula el consum d'O₂

per part dels gàmetes, però sense afectar la glucòlisi.

. Els ions PO_4^{3-} poden estar relacionats amb la formació i el manteniment del metabolisme a través de l'AMP_c el qual sembla estar íntimament lligat amb els fenòmens de capacitació, fertilització i motilitat de l'espermatozoide (veure 1.1.).

. El Ca^{2+} és considerat com un dels ions més importants en els processos fecundatius, indispensable tant per a la reacció acrosòmica (R.A.) com per a la penetració de la zona (Miyamoto i Ishibashi, 1975) i fusió de membranes espermatozoide-òcit (veure 1.1.1.4. i 1.1.1.6.). Sembla que, a més a més, és essencial perquè es doni una bona motilitat de l'espermatozoide (hiperactivació) (Rogers, 1978; Fraser, 1983). El manteniment de la motilitat per part del Ca^{2+} pot ser mediat per una proteïna de la membrana que d'alguna manera modifiqui les seves propietats mecàniques de forma que la lliscada dels filaments de l'axonema es tradueixi en moviments útils de la cua (Heffner i Storey, 1981).

. El K^+ és un altre ió indispensable per a la fecundació, però si bé és imprescindible per a la fertilització dels òcits amb i sense zona pel·lúcida sembla no ser-ho per a la R.A. Fins i tot hi ha dades que apunten cap a un possible endarreriment de la capacitació i, com a conseqüència, de la R.A., per efecte del K^+ en altres espècies (Rogers i col., 1981),

L'absència de K^+ produeix una disminució de la intensitat del moviment del flagel i de l'habilitat de l'espermatozoide per travessar la zona, però això no pot explicar per si sol la manca de fertilització en el medi sense K^+ . Sembla que aquest efecte té lloc a nivell de fusió de membranes de l'espermatozoide i l'òcit, la naturalesa exacta del qual és encara desconeguda però podria ser a causa de la necessitat del ió per a mantenir el potencial de membrana juntament amb el Ca^{2+} .

A més a més, el K^+ és necessari per a la descondensació del cap de l'espermatozoide un cop realitzada la penetració en el citoplasma de l'òcit (Rogers i col., 1981).

La importància del K^+ ha fet pensar en un possible mecanisme de control

per part del tracte genital femení sobre la capacitat fecundant dels espermatozoides a través dels efectes sobre la capacitat-R.A. i la hiperactivació que presenta aquest ió (Fraser, 1983b).

. El Mg^{2+} s'ha trobat que pot actuar com a inhibidor de la R.A., fonamentalment actuant com a antagonista del Ca^{2+} . La seva presència al medi, malgrat sigui en quantitats baixes, es recomana per l'experiència i pel fet de ser essencial per al funcionament de l'ATPasa cilíar (Heffner i Storey, 1981).

FONTS ENERGÈTIQUES

Les fonts d'energia que proporciona el medi als gàmetes són la glucosa, el lactat i el piruvat.

El seu metabolisme és un factor importantíssim per al manteniment de la supervivència cel·lular, la capacitat, la R.A. i la fertilització.

Cal tenir en compte que l'acció i els requeriments d'aquestes substàncies no es poden generalitzar per a tots els mamífers perquè s'han detectat moltes diferències entre les distintes espècies estudiades.

La glucosa és una de les fonts d'energia més importants per a la capacitat, la hiperactivació i/o la fertilització ja que els espermatozoides assoleixen la R.A. en medi definit amb glucosa més piruvat (o lactat) en presència d'albúmina i sense cap fluïd biològic. Aquesta necessitat de glucosa sembla que es dona durant els darrers estadis de la capacitat, just abans de la R.A. (Fraser i Quinn, 1981). De tota manera l'efectivitat de la glucosa és considerablement incrementada quan s'afegeix al medi el lactat i el piruvat, passant d'un 20% de fertilització amb glucosa sola a un 94% quan s'hi troben tots tres elements (Hoppe, 1976).

L'acció sinèrgica de tots tres vindria donada pel fet que la glucosa sola o la glucosa i el piruvat sols no produirien un nombre suficient de molècules de NADH a través del cicle de Krebs suficient per a donar una concentració d'ATP òptima per a la capacitat i la R.A., de manera que els nivells d'ATP haurien d'ésser complementats per l'oxidació directa del lactat a piruvat intramitocondrialment amb l'ajut d'un isoenzim del lactat deshidrogenasa (LDH), la LDH-X que és específica dels espermatozoides i que ha estat detectada en l'hàmmster (Dravlan i Meizel, 1981).

El paper d'aquesta ATP encara no és del tot clar però podria actuar incrementant la síntesi d'AMPc tan important per al manteniment de la hiperactivació i capacitació (veure 1.1.1.3.). Una altra acció de l'ATP associada a la glucòlisi pot ser el transport de Na^+ - K^+ dependent de l'activitat d'una ATPasa que juntament a l'entrada de K^+ al citoplasma semblen ser ambdues necessàries per a la R.A. de l'espermatozoide.

En altres espècies (conill porquí), al contrari, s'ha detectat una inhibició de la capacitació i R.A. per part de la glucosa. Aquest efecte s'ha explicat com motivat per una disminució de la respiració per part de la glucosa, la qual cosa aniria contra l'increment respiratori necessari per a la capacitació (Rogers i col., 1979).

ALBÚMINA SÈRICA BOVINA (BSA)

L'albúmina sèrica pot actuar com un transportador molecular de baixa afinitat i alta capacitat per a una àmplia varietat de substàncies naturals, incloses hormones, ions, àcids grassos, aminoàcids i colesterol. A més a més, pot unir-se a les membranes cel·lulars i pot quelar ions de metalls pesats seqüestrant-los del medi. Per aquesta raó s'utilitza com a protector i estabilitzador dels medis de cultiu.

També té altres efectes directes sobre els espermatozoides que la fan un component essencial del medi de fertilització:

- . Es pensa que és un factor capacitant molt important (veure "Introducció") ja que s'ha comprovat que els espermatozoides no es capaciten en medis sense BSA.

- . Sembla que és responsable del manteniment i/o de l'increment de la motilitat dels espermatozoides durant la penetració de la zona pel·lúcida (Quinn i col., 1982) (és possible que aquest efecte sigui a través d'una acció sobre els nivells d'AMPc de l'espermatozoide).

- . Una tercera funció de la BSA seria la de mantenir i/o activar els enzims responsables de la penetració de la zona pel·lúcida. S'ha demostrat que l'albúmina incrementa l'activitat de la hialuronidasa acrosòmica en l'hàmsster (Quinn i Whittingham, 1982a).

Quant al tipus de BSA emprada en el medi de fecundació s'utilitza la Fracció V perquè conté un nivell baix d'àcids grassos i, tal com s'ha vist en l'hàmsster i en el ratolí, la BSA amb baix contingut d'àcids grassos posseeix una major capacitat d'inducció de la R.A.

ANTIBIÒTICS

Sulfat d'estreptomina i penicil.lina G sòdica. S'introdueixen ambdós al medi per tal d'evitar o retardar les possibles infeccions bacterianes que serien funestes per a la fertilització i la supervivència dels gàmetes.

INDICADOR DE pH

Roig de fenol. És interessant de disposar d'un indicador de pH que avisi dels canvis produïts al medi. Com veurem més endavant el pH és un factor important que cal controlar. A la pràctica es poden detectar petites variacions del pH simplement observant el color dels medis.

CARACTERÍSTIQUES FÍSIQUES DEL MEDI

.La pressió osmòtica (π) del medi cal que sigui isotònica amb els gàmetes que hi introduïm. La π es mesura en osmol que equival al pes molecular en grams de substància dissolta que no es pot difondre ni ionitzar. D'altra banda, si una substància s'ionitza donant dos ions, un osmol serà la meitat del pes molecular en grams de la substància. En general s'utilitza el mosmol per ser més manejable.

L'osmolalitat teòrica (osmol/Kg d'aigua) idònia dels medis emprats es situa entre els 308 i 380 mosmol/Kg. En realitat l'atracció o repulsió intermolecular en la solució fa disminuir o augmentar, respectivament, l'osmolalitat real de la solució. Com sigui que en general hi ha més atracció que no pas repulsió l'osmolalitat real correspon a un 93% aproximadament de la teòrica (Guyton, 1983) la qual cosa fixa aquests valors entre 286 i 353 mosmol/Kg. El medi que hem emprat té una π real de 291 mosmol/Kg.

. El pH sembla no ser un factor excessivament restrictiu de la pene|tració dels oòcits ja que aquesta es dóna entre pH 6 i 8.5, essent l'òp tim entre 7.3 i 7.7 (Rogers, 1978).
| |

El nostre medi es manté estable a pH 7.4 mercès al sistema de tampó HCO_3^- - CO_2 de l'atmosfera de l'incubador. Aquest valor és considerat com el millor per a la fertilització, encara que valors més àcids semblin afavorir la motilitat dels espermatozoides i valors més bàsics semblin afavorir el creixement dels embrions a costa de produir una polispèrmia més elevada (Bavister, 1981).

2.1.1.2. Medi de cultiu d'embrions: M₁₆

Està basat en una solució de Krebs-Ringer bicarbonatada i desenvolupat per Whittingham (1971).

COMPOSICIÓ

	mM
NaCl	94.59
KCl	4.78
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.71
KH_2PO_4	1.19
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.19
NaHCO_3	25.07
Glucosa	5.56
Piruvat sòdic	0.33
Lactat sòdic	23.28
BSA (cristal.litzada i liofilitzada)	4 mg/ml
Penicil.lina G sòdica	10^5 ui
Estreptomina sulfat	0.05 mg/ml
Roig fenol	0.01 mg/ml

Malgrat que els components d'ambdós medis siguin semblants, els requeri ments dels gàmetes i els embrions no tenen perquè coincidir.

Per això comentarem els trets diferencials amb el medi T₆ ja descrit, o bé els components que, malgrat ser els mateixos, tenen una acció diferent.

SALS IÒNIQUES (Whittingham, 1971)

Les necessitats iòniques per al desenvolupament varien segons els estadis que s'estudiïn.

. A 2 cèl.lules el K⁺ i el Ca²⁺ són essencials per al desenvolupament. El Ca²⁺ és considerat com a necessari per a l'estabilitat de les membranes, la permeabilitat i la interacció cèl.lula-cèl.lula, especialment en el moment de la compactació per a formar la mòrula (Brackett, 1981). La seva manca produeix un alentiment de les divisions, mentre els blastòmers esdevenen esfèrics i amb un contacte intercel.lular mínim.

. A 8 cèl.lules s'ha demostrat que l'omissió de K⁺, Mg²⁺ i Ca²⁺ impedeix totalment el creixement, mentre que el desenvolupament s'endarrerix per la manca de PO₄³⁻.

. El sistema HCO₃⁻-CO₂ té una gran importància en el desenvolupament embrionari, no sols pel seu paper de tampó, sinó en altres aspectes independents d'aquest, ja que medis tamponats amb altres sistemes (Hepes, fosfat, etc.) són incapaços de mantenir el creixement de l'embrió. Això seria perquè el sistema bicarbonatat intervindria en processos biosintètics importants com són la condensació i la fixació del CO₂ amb el piruvat per la piruvat carboxilasa i la malat deshidrogenasa, d'una banda, i per l'altra el requeriment de HCO₃⁻ per la síntesi de novo de pirimidines, fonamentalment als estadis de transició de mòrula a blastòcit que és quan s'incrementa la síntesi de RNA (Brackett, 1981).

FONTS ENERGÈTIQUES

Les necessitats energètiques dels embrions són molt semblants a les dels gàmetes en general, però varien segons els estadis del desenvolupament, detectant-se un canvi gradual de substrats energètics en aquest procés.

Durant els dos primers dies de creixement d'una a quatre cèl.lules, el 90-100% del consum d'O₂ per part de l'embrió es pot atribuir a l'oxidació del piruvat, mentre que la de la glucosa és molt baixa. Aquesta com

porta menys del 10% del consum d'O₂ per part de l'òdit, però s'incrementa unes cent vegades, a través de la via d'Embden-Meyerhof i del cicle de Krebs als estadis pre-implantacionals, fonamentalment a l'estadi de blastòcit (Brackett, 1981).

El piruvat té una altra funció a part del metabolisme energètic com és l'intervenir en els processos biosintètics, incorporant-se juntament amb el CO₂ a les proteïnes embrionàries durant les primeres fases del desenvolupament (Whittingham, 1971). Els requeriments de piruvat semblen estar associats al pH. Així una disminució del pH del medi dona com a resultat una disminució de la concentració òptima de piruvat per al desenvolupament de l'embrió.

ALBÚMINA SÈRICA BOVINA (BSA)

La BSA té probablement altres funcions a part de la ja esmentada d'equilibrar el medi. Se li han suggerit diferents tipus d'acció com són l'aportació d'aminoàcids, la reducció del rentat d'aminoàcids endògens de l'embrió, l'estabilització de les membranes, l'extracció de ions metàl·lics tòxics del medi de cultiu o bé com a vehicle d'aportació de nutrients inidentificats associats a la BSA.

Per exemple un component essencial associat a la BSA són els àcids grassos necessaris per al desenvolupament ja que són utilitzats tant per a la incorporació de lípids com per a la producció d'energia a l'embrió. Efectivament la capacitat dels embrions de ratolí de sintetitzar fosfolípids i esteroides, el metabolisme dels quals sembla essencial per a la citoquinesi i la compactació cel·lular, és baixa fins a l'estadi de vuit cèl·lules (Kane i Headon, 1980; Quinn i Whittingham, 1982b).

És per aquesta necessitat d'àcids grassos que s'utilitza la BSA cristallitzada i liofilitzada ja que en conté més que no pas la Fracció V utilitzada per a la fertilització.

Hi ha altres "contaminants" de la BSA utilitzada normalment, que semblen promoure l'eclosió del blastòcit de la zona pel·lúcida. Aquests factors podrien ser o estar associats a elements d'elevat pes molecular (Kane i Headon, 1980).

Quant a l'aportació de nitrogen fixat en forma d'aminoàcids per part de la BSA, el nivell d'incorporació d'aminoàcids és, en general, baix en els primers estadis de divisió, però s'incrementa marcadament entre els estadis de vuit i setze cèl.lules per assolir nivells elevats en mòrula-blastòcit, seguint un patró semblant al dels àcids grassos.

CARACTERÍSTIQUES FÍSIQUES

Les condicions de pH i π requerides són idèntiques al medi T₆, encara que sembla que condicions lleugerament hipotòniques (242-276 mosmol/Kg) poden afavorir les primeres fases del desenvolupament.

El medi té un sistema de tampó bicarbonatat que només manté el pH estable en una atmosfera al 5% de CO₂; per això en cas de menester manipulacions perllongades fora de l'incubador s'ha desenvolupat un altre medi.

2.1.1.3. Medi de manipulació: M₂

COMPOSICIÓ

	mM
NaCl	94.57
KCl	4.78
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.71
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19
NaHCO ₃	4.15
Glucosa	5.56
Piruvat sòdic	0.33
Lactat sòdic	23.28
BSA (cristal.litzada i liofilitzada)	4 mg/ml
Penicil.lina G sòdica	10 ⁵ ui
Estreptomicina sulfat	0.05 mg/ml
Roig fenol	0.01 mg/ml
HEPES	20.85

L'única diferència amb l'M₁₆ és la disminució de la concentració de bicarbonat i la inclusió de l'Hepes (àcid N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfònic) com a tampó, el qual el fa estable en l'aire.

Si bé aquesta substància és força efectiva quant al manteniment del pH per al medi de fecundació no s'utilitza perquè sembla produir anomalies en la formació dels pro-nuclis (Bavister, 1981).

2.1.2. Condicions de cultiu

La complexitat dels esdeveniments que han de tenir lloc en una FIV i el seu posterior desenvolupament embrionari fan que els gàmetes i embrions necessitin estar en un ambient estable i favorable.

Aquest ambient ha de complir un seguit de condicions, que són les següents:

ESTERILITAT

És obvi que qualsevol tipus de contaminació, ja sigui bacteriana, vírica o fúngica tindrà unes conseqüències fatals per a tot el procés de cultiu in vitro.

Cal, doncs, que els medis, el material i el lloc de treball siguin estèrils o bé tinguin unes condicions de desinfecció raonables.

HUMITAT

Tot el cultiu ha de tenir lloc en un incubador amb una atmosfera saturada d'humitat.

Això és necessari perquè no es produeixi una evaporació del medi, cosa que provocaria un canvi desastrós en la seva composició i característiques físiques (π i pH).

TEMPERATURA

És evident que la temperatura ha de ser estable durant el procés i igual a la del cos de la majoria dels mamífers, 37°C.

L'estabilitat s'aconsegueix utilitzant plaques calefactores durant el temps de manipulació en el qual els medis hagin d'estar fora de l'incubador.

OLI DE PARAFINA

A fi de mantenir l'estabilitat del medi s'ha emprat sovint el cultiu cel.lular a sota l'oli de parafina (parafina líquida, vaselina líquida).

Utilitzant oli esterilitzat en autoclau i equilibrat amb el medi i l'atmosfera de CO_2 de l'incubador s'aconsegueix, d'una banda, evitar contaminacions provinents de l'aire i, de l'altra, mantenir estable la temperatura i el pH durant les manipulacions fora de l'estufa.

L'oli equilibrat amb el CO_2 conté aquest gas dissolt, la qual cosa permet, durant un quant temps, mantenir les condicions del tampó HCO_3^- - CO_2 .

Hi ha, però, un vessant negatiu en la utilització de la parafina, i és la seva possible toxicitat contra els embrions. El tipus de parafina emprat (lleuger, amb un pes específic de 0.830 a 0.870 g/cm^3) no és excessivament restrictiu, però la fabricació i la posterior esterilització fan que hi puguin aparèixer elements tòxics. Per això s'opta per fer un test de supervivència embrionària a cada nova remesa.

COMPOSICIÓ DE L'ATMOSFERA

Pràcticament tots els autors coincideixen en presentar dues opcions de composició de gasos de l'atmosfera de l'incubador per a la FIV i per al desenvolupament embrionari pre-implantacional. Aquestes són:

Primera: 5% CO_2 , 20% O_2 , 75% N_2

Segona: 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2

Ambdues opcions presenten un 5% de CO_2 ; l'única diferència rau en la quantitat d' O_2 present, ja que el N_2 només actua desplaçant en un sentit a altre la quantitat d' O_2 .

. Per a la FIV:

En principi la FIV i la supervivència del zigot no estan afectats negativament pel 20% d'O₂ present en l'aire. Com sigui que els nostres estudis no requereixen el creixement embrionari fins a estadis avançats del procés pre-implantacionals hem utilitzat la primera composició gasosa.

. Per al creixement d'embrions pre-implantacionals:

La concentració idònia d'O₂ per al desenvolupament embrionari s'ha fixat en un 5%. En general l'absència d'O₂ o de valors inferiors al 0.56% impedeixen el creixement de la mateixa manera que ho impedeixen concentracions superiors al 20% (Whittingham, 1971). Aquests nivells es corresponen bé amb la quantitat d'O₂ present en l'úter de rata (del ratolí no se'n tenen dades però probablement siguin molt semblants) obtingudes durant els quatre primers dies de gestació que estan entre 38 i 42 mm de Hg de pressió parcial (5.2-5.9% d'O₂).

Quant al nombre de divisions de l'embrió en relació a la concentració d'O₂ s'ha proposat una hipòtesi que suposa que l'embrió aprofitaria un gradient d'O₂ per a determinar la situació de cadascun dels blastòmers, sense descartar altres factors microambientals com poden ser les concentracions de nutrients i els materials metabòlics de rebuig, així com també els contactes entre blastòmers (Quinn i Harlow, 1978; Harlow i Quinn, 1982).

Si aquest model fos cert les cèl.lules amb una tensió d'O₂ menor es dividirien més activament ja que correspondrien a les que haurien de donar la ICM (massa cel.lular interna); en canvi les altres cèl.lules ho farien més lentament ja que correspondrien al que seria el trofòderma.

L'augment de la freqüència de divisió a causa del gradient estaria correlacionada amb la disminució de la durada del cicle cel.lular i lligada a l'increment de l'activitat de la DNA polimerasa.

L'efecte dels diferents nivells d'O₂ sobre el desenvolupament s'ha suposat que seria a través d'alteracions del potencial d'oxidació-reducció en l'òcit i/o embrió. El manteniment d'aquest potencial estaria estre-

tament lligat a les fonts energètiques mitjançant concentracions òptimes de piruvat i lactat que mantindrien (a través del lactat deshidrogenasa) una relació $\text{NAD}^+ : \text{NADH} + \text{H}^+$ adequada (Brinster, 1965).

2.1.3. Font d'òcits

En general es considera que existeixen tres tècniques fonamentals d'obtenció d'òcits que depenen del lloc on s'obtinguin:

- dels fol·licles, abans de l'ovulació.
- de la superfície de l'ovari, després de l'ovulació.
- de l'oviducte, després de l'ovulació.

Cadascuna d'aquestes tècniques podria subdividir-se: segons si el creixement i la maduració dels òcits es fa pel cicle natural o bé si s'indueix per estimulació hormonal externa. Aquesta estimulació generalment no es realitza amb les pròpies hormones sinó amb anàlogues de més fàcil obtenció, com són la PMGS (pregnant mare serum gonadotrophin) anàloga de la FSH i la HCG (human chorionic gonadotrophin) anàloga de la LH.

OÒCITS FOL·LICULARS

La seva obtenció implica, en certs casos, l'extracció dels ovaris i el trencament dels fol·licles per a extreure'n els òcits i cultivar-los in vitro a fi que madurin.

Malgrat aquesta aparent senzillesa els òcits obtinguts tot i ser morfològicament i citogenèticament "normals" són difícils de fecundar, i, si ho fan, no s'aconsegueix un bon desenvolupament embrionari.

Sembla que les cobertes oocitàries no són imprescindibles per a aquesta maduració però sí que s'ha descrit la importància de les hormones, fonamentalment la LH, per a obtenir una bona freqüència de penetració i desenvolupament dels zigots (Binor i Wolf, 1979; Shalgi i col., 1979).

L'acció d'aquesta hormona encara no és coneguda del tot però sembla que podria eliminar algun inhibidor de la maduració aportat per les cèl·lules de la corona radiata. És quasi segura la relació de les cèl·lules

del cumulus amb la maduració induïda per gonadotrofines ja que el trencament de llur acoblament elèctric (gap junction) amb l'òcit pot disparar la represa de la maduració (Binor i Wolf, 1979).

Existeix també la possibilitat d'extreure l'òcit del fol·licle pre-ovulatori a través d'una laparatomia mitjançant un seguiment del cicle amb tècniques d'estudi del nivell hormonal (per exemple, amb radioimmunoassaig, Taymor i col., 1982) o amb control ultrasònic dels fol·licles. Aquest és un mètode costós i només s'empra en els casos en què cal respectar la femella perquè és molt valuosa.

OÒCITS DE LA SUPERFÍCIE DE L'OVARI

Aquest tipus només ha estat descrit en el conill (Oliphant i Ludeman, 1981). Inclou la maduració per tractament hormonal extern perquè cal conèixer molt bé el moment de l'ovulació.

El mètode consisteix en injectar una dosi ovulatòria de HCG i al cap de dotze hores extreure els ovaris i treure'n les masses de cèl·lules fol·liculars i els oòcits associats que es troben enganxats a la superfície de l'ovari.

Aquest procediment permet obtenir oòcits madurs i que no han estat exposats a l'ambient oviductal. És un sistema que respon a requeriments molt concrets per a l'estudi de l'ambient oviductal i la seva influència en la fecundació.

OÒCITS OVIDUCTALS

Són els més emprats, en general, perquè són els més fàcils d'obtenir i no presenten problemes de maduració associats.

N'hi ha de tres categories que depenen de l'estímul hormonal:

- . Cicle natural
- . Cicle controlat
- . Superovulació

- . Ovulació natural

És emprada en els casos en què la dosi hormonal extra pugui afectar

als resultats de l'estudi que es duu a terme.

En aquest cas el moment de l'ovulació no se sap amb seguretat i, per tant, es pot produir un envelliment dels gàmetes femenins previ a la fecundació que doni certes anomalies.

Els animals s'han de mantenir en condicions estables de temperatura (20-23°C) i cicle de llum (14 h de llum i 10 h de foscor).

El dia de l'ovulació es pot determinar ja sigui estudiant frottis vaginals o simplement examinant l'aspecte extern de la vulva.

El cicle ovulatori en ratolins dura aproximadament quatre dies, encara que hi ha variacions que depenen de quina soca es tracti.

Un sistema útil d'augmentar el nombre d'oòcits disponibles és mantenir totes les femelles a la mateixa caixa de manera que es posin en fase i totes es trobin al mateix estadi del cicle (Biggers i col., 1971).

. Ovulació controlada

Serveix per a sincronitzar els cicles de diferents femelles i per a conèixer bé el moment de l'ovulació.

Dosis baixes de gonadotrofina (1-2 ui de PMSG seguides de 1-2 ui de HCG 48 h després) són suficients per a sincronitzar els cicles, però sense provocar una superovulació, de manera que al cap de dotze hores del HCG s'obtenen de cinc a quinze oòcits a punt d'ésser fecundants, sense els desavantatges suggerits per la superovulació (Biggers i col., 1971).

. Superovulació

L'interés per a obtenir un nombre elevat d'oòcits susceptibles de ser fecundats, així com el control del temps en el que té lloc l'ovulació, ha fet desenvolupar la tècnica de la superovulació consistent en la injecció de PMSG seguida al cap de 48 h d'una altra injecció de HCG. En un cicle ovulatori normal una femella de ratolí pot ovular de cinc a quinze oòcits, mentre que en una superovulació se n'obtenen de vint a quaranta per terme mitjà (depèn de les soques emprades) arribant-se fins i tot, en casos excepcionals, a vuitanta-noranta oòcits per femella.

En un cicle normal és la FSH de la pituitària la que estimula el creixement dels fol·licles i la formació de l'antre. Aquest creixement des del tipus 5b (cinc capes de cèl·lules de la granulosa) al 8 (fol·licle de Graaf) (fig. 22) té lloc en cinc dies, mentre que tot el període de creixement fol·licular, des del 3b (una sola capa de cèl·lules de la granulosa) fins a l'ovulació en requereix dinou.

En un cicle de superovulació la PMSG sembla induir o promoure el creixement dels fol·licles d'una mida mitjana (pool precursor) del tipus 5b fins a una altra mida adequada perquè el HCG estimuli la continuació de la meiosi més enllà de l'estat de dictiotè.

La injecció de PMSG en animals immadurs indueix el creixement dels fol·licles però sense la consegüent ovulació excepte si al moment de la injecció hi ha fol·licles pre-ovulatoris.

La represa de la meiosi té lloc després de la injecció de HCG. La vesícula germinal comença a trencar-se al cap de dues hores, la qual cosa assenyala el final de la profase I. La durada en hores de cadascun dels estadis es reflexa en el quadre següent (Rohrbörn i Hansmann, 1971):

<u>Temps deprés de HCG (hores)</u>	<u>Fase</u>
1.5	Dictiotè primerenc
2	Dictiotè tardà
2.5	Contracció filaments de cromatina
3	Postdictiotè
3.5	Diplotè tardà
4	Diacinesi
5	Metafase I (comença l'anafase)
8	Intercinesi (comença la Profase II)
13	Ovulació-Metafase II

(Veure fig. 23)

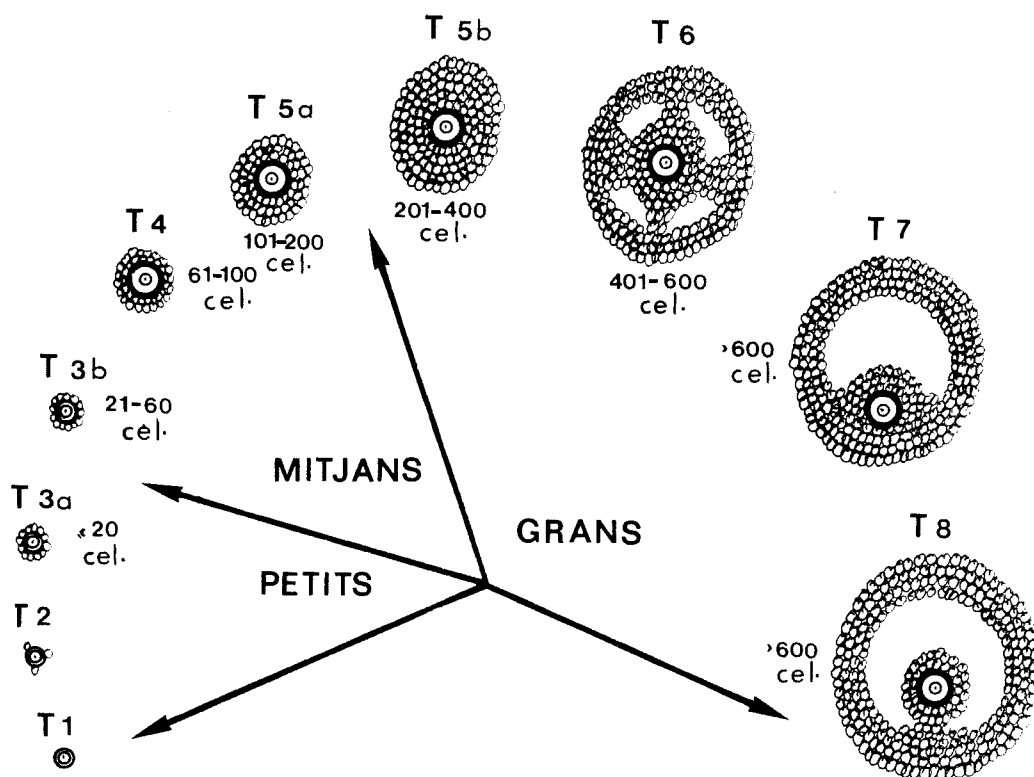


Fig. 22.- Esquema del desenvolupament d'un fol.licle, classificat, segons Pedersen (1972), pel nombre de cèl.lules de la granulosa que el componen.