



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**Departamento de Fisiología**

**Facultad de Veterinaria**

## **Función del sistema plasminógeno- plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos.**

**Luis Alberto Grullón Yunén**

2010



UNIVERSIDAD  
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

*Facultad de Veterinaria*

D<sup>a</sup>. Pilar Coy Fuster, Profesora Titular de Universidad del Área de Fisiología Veterinaria en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Función del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos", realizada por D. Luis Alberto Grullón Yunén, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Octubre de 2010



UNIVERSIDAD  
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

*Facultad de Veterinaria*





UNIVERSIDAD  
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

*Facultad de Veterinaria*

D<sup>a</sup>. Raquel Romar Andrés, Profesora Contratada Doctora del Área de Fisiología Veterinaria en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada Función del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos realizada por D. Luis Alberto Grullón Yunén bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Octubre de 2010

  
  
UNIVERSIDAD  
DE MURCIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA  
*Facultad de Veterinaria*



D. Jorge de Costa Ruiz, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología Animal y Director del Departamento de Fisiología, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos“, ha sido realizada por D. Luis Alberto Grullón Yunén , bajo la inmediata dirección y supervisión de D<sup>a</sup>. Pilar Coy Fuster y D<sup>a</sup>. Raquel Romar Andrés, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 27 de octubre de 2010



**Institut für Nutztiergenetik**  
Institute of Farm Animal Genetics

Standort Mariensee | Höltystr. 10 | 31535 Neustadt

Luis Grullón  
Dept. Fisiología  
Facultad de Veterinaria - Universidad de Murcia  
30.100 Murcia (España - Spain)**Prof.Dr. Detlef Rath**Höltystr. 10  
31535 Neustadt-MarienseePhone: 05034 871 144 / 188  
Fax: 05034 871 101  
E-Mail: detlef.rath@fli.bund.de  
Datum: 8. Oktober 2010

Az:

**CERTIFICADO**

Por la presente confirmo que Luis Alberto Grullón Yunén ha trabajado en el Instituto arriba mencionado desde el 2 de Mayo hast el 2 de Agosto de 2010. Él trabajó fundamentalmente en el Departamento de Biotecnología y tuvo la posibilidad de aprender nuevas técnicas de biotecnología reproductiva y manejo animal "..



Prof. Dr. Detlef Rath

24<sup>th</sup> October 2010

A quien corresponda,

En base a la información proporcionada la tesis doctoral de Luis Alberto Grullon Yunen contiene un diseño experimental claro y bien estructurado. La hipótesis presentada ha sido correctamente evaluada experimentalmente. Se han realizado suficientes replicados por grupo y los datos se han analizado adecuadamente. El candidato ha preparado una descripción detallada de los estudios realizados y ha analizado los experimentos de manera lógica y clara.

En consecuencia, considero que el manuscrito contiene los requisitos mínimos necesarios para ser defendido frente al comité evaluador de tesis doctorales.

Cordialmente,



Dr. Ramiro Alberio, DVM, PhD



## **A quien corresponda**

El sistema plasminógeno-plasmina (PLG-PLA, también llamado sistema fibrinolítico) se relaciona con la remodelación proteolítica tisular y la migración celular, incluyendo los procesos de invasión de células tumorales, angiogénesis, o la invasión del trofoblasto durante la nidación y la placentogénesis. Entre los principales componentes del sistema encontramos a los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs) que pertenecen a la familia de las serpinas (inhibidores del tipo serín-proteasa) ya ampliamente estudiados. En los aparato reproductivo, el sistema PLG-PLA se ha relacionado con la ovulación, la dispersión de las células del cumulus, la espermatogénesis, la motilidad espermática, la reacción acrosómica y la implantación. Por otra parte, el rol del sistema PLG-PLA en la fecundación está lejos de ser clarificado, a pesar de que los componentes de este sistema están presentes en los gametos y en el oviducto.

La Tesis Doctoral titulada “*Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos*”, presentada por Luis Alberto Grullón Yunén, ha intentado esclarecer si el sistema PLG-PLA afecta al proceso de fecundación en las especies bovina y porcina así como determinar qué componentes son viables y operativos, empleando un sistema de fecundación in vitro y análisis del ovocito y los espermatozoides. Los resultados obtenidos demuestran que el PLG está localizado en la zona pelúcida (ZP) y en las proximidades del oolema de los ovocitos bovinos y porcinos y que tanto tPA como uPA están presentes en ambas localizaciones antes de la fecundación. Sin embargo, una vez fecundados, los ovocitos pierden la mayor parte del PLG y sus activadores del oolema. En la ZP, también la señal del PLG y sus activadores disminuye tras la fecundación, quedando circunscrita a los lugares donde se observan espermatozoides, indicando que el sistema se activa durante la interacción de los gametos, teniendo un efecto particular en el bloqueo (más bien primario que secundario) de la polispermia

Esta Tesis, presentada como monografía, es comprensible, proporciona una revisión razonable de la literatura, una hipótesis adecuada y una puesta a punto metodológica extensamente descrita. Los resultados están claramente presentados y son objeto de una discusión completa.

Este revisor externo considera que el ensayo de Tesis Doctoral titulado *Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos*”, presentado por Luis Alberto Grullón Yunén, bajo la supervisión de la Dra. Pilar Coy Fuster y la Dra. Raquel Romar Andrés es apta para su defensa pública y evaluación por un jurado para obtener el grado académico de Doctor en la Universidad de Murcia con la mención de Doctorado Europeo.

Linköping, 29 de Octubre de 2010.

Prof Dr Heriberto Rodríguez-Martínez

---

| Office address   | Telephone No   | Telefax          |                 |
|--|--|------------------|-----------------|
| IKE-AIR—HU Campus US-Floor 10<br>Faculty of Health Sciences<br>Linköping University<br>SE-581 85 Linköping<br>SWEDEN | +46(0)10 1031522 (direct)<br>E-mail Heriberto.Rodriguez@liu.se | +46(0)10 1030000 | +46(0)13 132257 |

*Este trabajo experimental ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, el Ministerio de Ciencia e Innovación y el FEDER (Proyectos AGL2006-03495 y AGL2009-12512-C02-01).*

*Luis Alberto Grullón Yunén disfrutó de una Beca de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador de la Universidad de Murcia desde el curso 2006-2007 hasta el curso 2008-2009.*

*Luis Alberto Grullón Yunén disfrutó de una subvención de la Secretaría General de Universidades para estancias de movilidad de estudiantes para la obtención de la Mención Europea en el título de Doctor durante el curso 2009-2010.*



*A mi familia*

*A Hans Schaeffler*

## **Agradecimientos**

A mi familia, por su estímulo, apoyo y preocupación demostrada durante toda mi estancia fuera de casa.

A Pilar Coy y Raquel Romar, por los conocimientos que me han transmitido y por la dirección de esta Tesis.

A Joaquín Gadea, por su participación y sus enseñanzas en todo momento.

A Carmen Matás, por su disposición, colaboración y la amistad que me ha ofrecido.

A Salvador Ruiz, por su ayuda y afecto en este tiempo.

A Francisco García-Vázquez, por las sugerencias, implicación y compañerismo demostrado durante todos estos años.

A Juan Antonio, Soledad, Darío y Juan, por su contribución y el gran soporte técnico que me han prestado en el laboratorio.

A María Dolores, Aitor, Irene y Sebastián, por hacer tan gratificantes las muchas horas de trabajo compartidas.

A Luis César, David y Manolo, por el ánimo y la ayuda que me dieron en los primeros años, así como por los buenos recuerdos que han dejado.

A Karen, Luis y Jon, por los buenos momentos compartidos en el laboratorio.

A Manuel Avilés, por los sabios consejos que he recibido a lo largo de estos años.

A la Universidad de Murcia, por la financiación económica concedida para la realización de la Tesis.

A Detlef Rath, por acogerme y brindarme la oportunidad de estar en su laboratorio.

A Toñi, Juana y Pepe, por su asesoría y desinteresadas atenciones personales.



Al Matadero de El Pozo y Orihuela, en especial a Pedro y Paqui, por la donación de las muestras empleadas y colaboración.

A Gabriel, Juan de Dios, Erika, Nadine y Lenka, por ser algo más que compañeros de trabajo.

A Juan Carlos y Javier, por su gran aprecio y acertadas recomendaciones en todo momento.

A Carlos de Jódar, por su paciencia en resolver no sólo los problemas informáticos.

A las familias Ruiz, De Ondiz, Carrasco y Profet, por su acogida y por considerarme parte de ellas.

A Hans Schaeffler, por haber sido guía y consejero durante mucho tiempo.

A Alfonso, Claudia, Vladimir, Adrell, Laurita, Sofía y Carlitos, por su constante apoyo a pesar de la distancia que nos separa.

A Valentín, Pedro, María, Ana, Alba, Juan, Gerson y José, por todo lo que han hecho por mí.

| <b>ÍNDICE</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>1. RESUMEN .....</b>  | 2             |
| <b>2. SUMMARY .....</b>  | 9             |
| <b>3. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>  | 15            |
| <b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | 19            |
| <b>4.1. Fecundación .....</b>  | 19            |
| <b>4.1.1. El ovocito .....</b>   | 19            |
| 4.1.1.1. El ovocito en el folículo preovulatorio .....   | 20            |
| 4.1.1.2. La ovulación .....  | 23            |
| 4.1.1.3. El ovocito en el oviducto .....   | 25            |
| 4.1.1.3.1. Vida media y envejecimiento .....   | 25            |
| 4.1.1.3.2. Transporte .....  | 26            |
| 4.1.1.3.3. Maduración zonal .....  | 27            |
| <b>4.1.2. El espermatozoide .....</b>  | 28            |
| 4.1.2.1. Capacitación espermática (CA) y reacción acrosómica (RA) .....  | 29            |
| 4.1.2.2. Etapas finales de la capacitación en el reservorio espermático .....  | 33            |
| <b>4.1.3. Interacción espermatozoide-ovocito y fecundación.....</b>  | 36            |
| 4.1.3.1. El espermatozoide a través de las células del <i>cumulus oophorus</i> .   | 36            |
| 4.1.3.2. Unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP).....   | 37            |
| 4.1.3.3. Fusión de las membranas plasmáticas .....   | 39            |
| <b>4.2. Bloqueo de la polispermia .....</b>  | 41            |
| <b>4.2.1. Mecanismos previos a la unión espermatozoide-ovocito .....</b>   | 41            |
| 4.2.1.1. Regulación por el aparato genital femenino del número de<br>espermatozoides que alcanzan el lugar de la fecundación ..... | 41            |
| 4.2.1.2. Cambios del ovocito en el oviducto .....  | 42            |
| <b>4.2.2. Mecanismos posteriores a la unión espermatozoide-ovocito .....</b>   | 43            |
| 4.2.2.1. Bloqueo a nivel de membrana plasmática .....  | 43            |
| 4.2.2.2. Bloqueo a nivel de ZP y reacción cortical.....  | 45            |
| <b>4.3 El sistema plasminógeno-plasmina .....</b>  | 48            |
| <b>4.3.1. Componentes del sistema plasminógeno-plasmina .....</b>  | 51            |
| 4.3.1.1. Plasminógeno (PLG) .....  | 51            |
| 4.3.1.2. Plasmina (PLA) .....  | 54            |
| 4.3.1.3. Activadores del plasminógeno (PAs) .....  | 55            |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.1.3.1. Activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) .....   | 55        |
| 4.3.1.3.2. Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) .....  | 56        |
| 4.3.1.4. Control de la expresión de tPA y uPA .....  | 58        |
| 4.3.1.5. Estreptoquinasa (STK) y estafiloquinasa (SAK).....  | 59        |
| 4.3.1.6. Receptores de tPA (tPA-R) .....   | 59        |
| 4.3.1.7. Receptores de uPA (uPA-R) .....   | 60        |
| 4.3.1.8. Inhibidores de los activadores de plasminógeno (PAIs).....  | 60        |
| 4.3.1.9. Inhibidores de la plasmina .....  | 63        |
| <b>4.3.2. Localización y función de los componentes del sistema plasminógeno-plasmina en el tracto reproductor de los mamíferos domésticos .....</b> | <b>64</b> |
| 4.3.2.1. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la maduración del ovocito y la expansión del <i>cumulus</i> .....                                | 65        |
| 4.3.2.2. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la ovulación .....   | 66        |
| 4.3.2.3. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la motilidad y capacitación espermática .....  | 68        |
| 4.3.2.4. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación y en el bloqueo de la polispermia .....   | 69        |
| 4.3.2.5. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la implantación del embrión .....  | 72        |
| <b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>76</b> |
| <b>5.1. Recogida y transporte de ovarios .....</b>   | <b>76</b> |
| <b>5.2. Obtención y maduración de ovocitos .....</b>   | <b>77</b> |
| 5.2.1. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos .....  | 77        |
| 5.2.2. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos porcinos .....   | 78        |
| <b>5.3. Obtención y procesado de espermatozoides .....</b>   | <b>80</b> |
| 5.3.1. Espermatozoides bovinos .....   | 80        |
| 5.3.2. Espermatozoides porcinos .....  | 83        |
| <b>5.4. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) .....</b>  | <b>85</b> |
| 5.4.1. FIV en la especie bovina .....  | 85        |
| 5.4.2. FIV en la especie porcina .....   | 86        |
| 5.4.3. Fijación, tinción y valoración microscópica de los ovocitos fecundados <i>in vitro</i> .....  | 87        |
| 5.4.4. Fecundación <i>in vitro</i> con plasminógeno (PLG) o plasmina (PLA) .....   | 88        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>5.5. Digestión de la zona pelúcida (ZP) .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>5.6. Detección mediante inmunocitoquímica de los componentes del sistema PLG-PLA en ovocitos bovinos y porcinos .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>5.7. Evaluación de la capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides bovinos y porcinos mediante citometría de flujo .....</b>                                    | <b>91</b>  |
| <b>5.7.1. Evaluación de la capacitación espermática (CA).....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>5.7.2. Evaluación de la reacción acrosómica (RA) .....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>5.8. Ensayo de unión espermatozoides-ZP .....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>5.9. Visualización en tiempo real del efecto de la plasmina sobre la unión espermatozoide-ZP en la especie porcina .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>5.10. Diseño experimental .....</b>  | <b>96</b>  |
| <b>5.10.1. Experimento 1. Efecto del PLG añadido al medio de cultivo a distintos tiempos sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina .....</b>             | <b>97</b>  |
| <b>5.10.2. Experimento 2. Efecto del PLG añadido al medio de cultivo a diferentes concentraciones sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina .....</b>    | <b>97</b>  |
| <b>5.10.3. Experimento 3. Efecto de la adición de PLA al medio de cultivo sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina .....</b>                            | <b>97</b>  |
| <b>5.10.4. Experimento 4. Inmunolocalización del PLG y sus activadores en ovocitos madurados <i>in vitro</i> bovinos y porcinos antes y después de ser fecundados .....</b> | <b>98</b>  |
| <b>5.10.5. Experimento 5. Efecto del PLG sobre la resistencia de la ZP de ovocitos bovinos y porcinos a la digestión en pronasa .....</b>                                   | <b>98</b>  |
| <b>5.10.6. Experimento 6. Efecto de la PLA sobre la resistencia de la ZP de ovocitos y porcinos a la digestión en pronasa .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>5.10.7 Experimento 7. Efecto del PLG y la PLA sobre la viabilidad, capacitación y estabilidad acrosomal de los espermatozoides bovinos y porcinos .....</b>              | <b>99</b>  |
| <b>5.10.8. Experimento 8. Efecto de la PLA sobre la unión espermatozoide-ZP en las especies bovina y porcina .....</b>  | <b>100</b> |
| <b>5.10.9. Experimento 9. Visualización en tiempo real del efecto de la adición de PLA sobre ovocitos fecundados .....</b>  | <b>101</b> |
| <b>5.11. Análisis estadístico .....</b>   | <b>101</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>6. RESULTADOS .....</b>   | <b>103</b> |
| <b>6.1. Experimento 1. El efecto del PLG añadido al medio de cultivo sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina es dependiente del momento en el que se añade.....</b> | <b>103</b> |
| <b>6.2. Experimento 2. El efecto del PLG añadido al medio de fecundación sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina depende de la dosis empleada .....</b>             | <b>106</b> |
| <b>6.3. Experimento 3. La adición de PLA al medio de fecundación afecta a los resultados de FIV en las especies bovina y porcina .....</b>   | <b>108</b> |
| <b>6.4. Experimento 4. La inmunolocalización del PLG y sus activadores en ovocitos madurados <i>in vitro</i> bovinos y porcinos se ve afectada por la fecundación .....</b>              | <b>111</b> |
| <b>6.4.1. Experimento 4.1 Inmunolocalización del PLG .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>6.4.2. Experimento 4.2. Inmunolocalización de tPA .....</b>   | <b>120</b> |
| <b>6.4.3. Experimento 4.3. Inmunolocalización de uPA .....</b>   | <b>126</b> |
| <b>6.5. Experimento 5. El PLG (1U) no afecta a la resistencia de la ZP de ovocitos bovinos y porcinos a la digestión en pronasa .....</b>  | <b>134</b> |
| <b>6.6. Experimento 6. La PLA (0.4 U) no afecta a la resistencia de la ZP de ovocitos y porcinos a la digestión en pronasa .....</b>   | <b>135</b> |
| <b>6.7. Experimento 7. El PLG (0.5 U) y la PLA (0.4 U) no disminuyen la viabilidad, capacitación y estabilidad acrosomal de los espermatozoides bovinos y porcinos .....</b>             | <b>136</b> |
| <b>6.7.1. Experimento 7.1. Resultados de viabilidad y capacitación .....</b>   | <b>136</b> |
| <b>6.7.2. Experimento 7.2. Resultados de viabilidad y reacción acrosómica .....</b>  | <b>138</b> |
| <b>6.8. Experimento 8. La PLA (0.4 U) desestabiliza la unión espermatozoide-ZP en las especies bovina y porcina .....</b>  | <b>140</b> |
| <b>6.9. Experimento 9. La adición de PLA sobre ovocitos fecundados permite visualizar en tiempo real la desestabilización de la unión espermatozoide-ZP .....</b>                        | <b>141</b> |
| <b>7. DISCUSIÓN .....</b>  | <b>144</b> |
| <b>7.1. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación bovina y porcina .....</b>   | <b>144</b> |
| <b>7.2. Inmunolocalización del plasminógeno y sus activadores en ovocitos madurados <i>in vitro</i> bovinos y porcinos antes y después de ser</b>  | <b>152</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>fecundados .....</b>  |            |
| <b>7.2.1. Inmunolocalización de plasminógeno .....</b>   | <b>152</b> |
| <b>7.2.2. Inmunolocalización de tPA .....</b>  | <b>155</b> |
| <b>7.2.3. Inmunolocalización de uPA .....</b>  | <b>160</b> |
| <b>7.3. Mecanismo de acción del sistema plasminógeno/plasmina en la<br/>    fecundación .....</b>  | <b>166</b> |
| <b>7.4. Propuesta de modelos biológicos compatibles con los resultados<br/>    obtenidos .....</b> | <b>171</b> |
| <b>8. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>178</b> |
| <b>9. CONCLUSIONS .....</b>  | <b>181</b> |
| <b>10. ABREVIATURAS .....</b>  | <b>184</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>188</b> |



# Resumen

## Resumen

## 1. RESUMEN

El sistema plasminógeno-plasmina (PLG-PLA), más conocido como sistema fibrinolítico por su papel en la disolución de los coágulos sanguíneos, está implicado en procesos de remodelación tisular y migración celular, tales como la invasión de los tejidos circundantes por las células patógenas o tumorales (Danø *et al.*, 1985; Ossowski *et al.*, 1973), la angiogénesis (Rifkin *et al.*, 1983) o la invasión del endometrio por el trofoblasto (Sappino *et al.*, 1989; Strickland *et al.*, 1976). Se trata de un imbricado sistema en el que participan distintos activadores e inhibidores que a su vez forman parte de diferentes cascadas de señalización intracelular (Binder *et al.*, 2007).

El sistema tiene como componente central al plasminógeno (PLG), sintetizado en forma de zimógeno inactivo principalmente en el hígado (Raum *et al.*, 1980), aunque también se ha descrito en otros lugares como los túbulos seminíferos (Saksela y Vihko, 1986). El PLG se activa transformándose en plasmina (PLA) por rotura de un enlace peptídico sencillo gracias a la acción de alguno de sus dos activadores, el activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) o el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), ambos pertenecientes a la familia de las serín proteasas.

El tPA es sintetizado principalmente por las células endoteliales (Danø *et al.*, 1985) y abunda en el plasma de la especie humana (Collen, 1987). Se han descrito receptores para tPA en la superficie de numerosos tipos celulares implicados en diversas funciones. La mayoría de estos receptores unen también PLG, favoreciendo la formación de PLA más eficientemente y de forma focalizada sobre la superficie celular. De esta forma contribuyen a la regulación de la fibrinólisis así como a la degradación de otras proteínas tanto de la membrana como de la matriz extracelular (ECM).

El uPA, por su parte, es una proteína secretada por las células endoteliales y epiteliales principalmente en los conductos excretores del organismo (como los túbulos renales) y fue descrito inicialmente en cultivos de células de carcinoma ovárico (Astedt y Holmberg, 1976). La unión de uPA a su receptor de membrana, uPAR, aumenta sus efectos biológicos, sean éstos dependientes o no de la proteólisis (Andreasen *et al.*, 1997; Sabapathy *et al.*, 1997; Shapiro *et al.*, 1996).

Una vez formada la PLA por la activación del PLG, ésta ejerce su efecto proteolítico asociado a la superficie celular y en la sangre degrada con gran eficacia la fibrina (Collen y Lijnen, 1995). Además, la PLA se une a una gran variedad de sustratos y es capaz de

degradar diferentes moléculas que forman parte de la matriz extracelular (ECM) y de la membrana basal, tales como la fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicanos y colágeno (Aguilar *et al.*, 2004; Irigoyen *et al.*, 1999).

La actividad proteolítica de todo este sistema está controlada, principalmente, por inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs). Estos inhibidores pertenecen a la familia de las serpinas (inhibidores de serín proteasas) y se conocen tres tipos, PAI-1, PAI-2 y PAI-3.

En el aparato reproductor, uno de los aspectos más estudiados del sistema PLG-PLA ha sido su relación con la ovulación, ya que contribuye a la degradación proteolítica de la pared folicular para permitir la salida del complejo *cumulus*-ovocito (revisado por Liu, 2004). También se ha demostrado su relación con la dispersión de la células del *cumulus* (D'Alessandris *et al.*, 2001), la espermatogénesis (Clermont, 1972; Vihko *et al.*, 1984), la motilidad espermática y la reacción acrosómica (Hong *et al.*, 1985; Taitzoglou *et al.*, 2003; Taitzoglou *et al.*, 2004) o la implantación (Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983).

Sin embargo, la relación del sistema PLG-PLA con la fecundación no está hoy día clarificada. Aunque a lo largo de los años se ha podido demostrar la presencia de algunos de los componentes del sistema PLG-PLA en los gametos (Huarte *et al.*, 1987a; Huarte *et al.*, 1985) y en el oviducto de los mamíferos (Kouba *et al.*, 2000a) el papel concreto que juega este sistema en la fecundación, si es que juega alguno, está por determinar. Por ello, el objetivo principal del presente trabajo consistió en averiguar si el sistema PLG-PLA afecta al proceso de fecundación y, en el caso de que así fuera, identificar los componentes del sistema que participan en dicho efecto y el mecanismo mediante el que actúan.

En la primera parte de nuestro trabajo experimental decidimos emplear la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) para estudiar el efecto del PLG y la PLA sobre el proceso de fecundación, ya que ésta es la herramienta disponible que más nos aproxima a la fecundación fisiológica. Como modelos experimentales elegimos el bovino y el porcino. Ambos son muy diferentes en cuanto a rendimiento en FIV ya que, mientras que en el primero, el número de espermatozoides que penetran cada ovocito suele estar próximo a uno, el segundo se caracteriza por el alto índice de penetraciones polispermicas que se obtienen cuando se utiliza la FIV (Coy *et al.*, 2008a). Por ello, decidimos emplear ambos modelos paralelamente en aquellos casos en los que el experimento pudiera ofrecer

alguna duda en relación a que el efecto observado pudiera depender del número de espermatozoides que penetraran cada ovocito.

A partir de ovarios recogidos en matadero, se procedió a la obtención y maduración *in vitro* de ovocitos bovinos y porcinos. Estos ovocitos fueron fecundados *in vitro* con espermatozoides de toros y verracos de fertilidad probada que se sometieron previamente a un proceso de selección mediante gradientes de densidad. Empleando PLG añadido al medio de cultivo, se realizaron estudios dosis-efecto (distintas concentraciones de PLG) y tiempo-efecto (PLG añadido 30 minutos antes, 30 minutos después, o al mismo tiempo que se añadían los espermatozoides al medio que contenía los ovocitos) durante la FIV bovina y porcina. Se evaluaron los resultados a las 18-20 horas del inicio del cultivo. Se comprobó que la adición de PLG al medio dificultaba, en términos generales, la entrada de espermatozoides al interior de los ovocitos y disminuía el número de espermatozoides que permanecían adheridos a la ZP tras ese tiempo. Este efecto era más marcado si se adicionaba el PLG 30 minutos después de añadir los espermatozoides a la placa que contenía los ovocitos que si se adicionaba 30 minutos antes. Además, el efecto era más evidente cuanto mayor era la dosis de PLG ensayada, y semejante al provocado cuando se adicionaba directamente PLA en concentraciones similares. Por lo tanto, dedujimos que el PLG que nosotros añadíamos al medio se estaba activando a PLA en nuestras condiciones de trabajo y que ésta era, en último término, la responsable del efecto observado.

Dado que en el medio de cultivo empleado para la FIV no se había añadido ningún activador del PLG, llegamos a la conclusión de que dichos activadores debían proceder necesariamente de los gametos y que debían liberarse durante el tiempo que permanecían en cultivo.

Una vez comprobamos que el sistema PLG-PLA tenía un papel en la fecundación, en la segunda parte de este estudio se emplearon técnicas de inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia de PLG y de sus activadores (tPA y uPA) en los ovocitos bovinos y porcinos. No se intentaron detectar dichos activadores en los espermatozoides porque ya existen suficientes estudios previos que los han evidenciado (Huarte *et al.*, 1987a; Smokovitis *et al.*, 1992). Sin embargo, en el caso del ovocito, sólo habíamos encontrado dos referencias en la bibliografía en las que se había detectado su relación con el PLG: una en el ratón, en el que Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993) demostraron que los ovocitos eran capaces de unir moléculas de PLG, y otra en el hámster, en el que

Jiménez Díaz *et al.* (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002) detectaron la presencia de PLG en ZP y membrana de ovocitos por técnicas de inmunofluorescencia indirecta.

Para la detección del PLG en los ovocitos se usó una técnica indirecta en dos capas, empleando un anticuerpo comercial policlonal anti-PLG producido en conejo como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a TRITC (isotiocianato de tetrametil rodamina) para poder visualizar el marcaje obtenido en el microscopio confocal. Para la detección de los dos activadores del plasminógeno se utilizó también inmunofluorescencia indirecta pero en este caso en tres capas. Se emplearon anticuerpos comerciales policlonales anti-tPA y anti-uPA producidos en cabra como anticuerpos primarios. Posteriormente se empleó un anticuerpo secundario anti-cabra producido en conejo y un anticuerpo terciario anti-conejo conjugado de nuevo a TRITC.

Los resultados obtenidos demostraron que el PLG se localiza en la ZP y en las proximidades del oolema de los ovocitos bovinos y porcinos, y que tanto tPA como uPA están presentes en ambas localizaciones antes de la fecundación. Sin embargo, una vez fecundados, los ovocitos pierden prácticamente todo el PLG y gran parte de la señal de los activadores en las cercanías del oolema. En la ZP, también la señal para el PLG y sus activadores disminuye tras la fecundación, quedando circunscrita normalmente a los sitios donde se observan espermatozoides unidos. Estos resultados indicaban que el sistema, de alguna manera, se debía activar durante el proceso de interacción espermatozoide-ovocito y provocar el efecto que habíamos observado en la primera parte del estudio, aunque quedaba por averiguar de qué modo ejercía tal efecto.

Por ello, en la tercera parte del presente trabajo se realizaron diversos experimentos con el fin de describir, al menos parcialmente, el mecanismo por el cual el sistema PLG-PLA provocaba el efecto observado en la fecundación. Para evaluar si este sistema, como se había sugerido (Zhang *et al.*, 1992) estaba implicado en el endurecimiento de la ZP post-fecundación descrito en el ratón (Moller y Wassarman, 1989) procedimos a incubar los ovocitos bovinos y porcinos en presencia o ausencia de PLG y de PLA. El endurecimiento post-fecundación se refiere al incremento de la resistencia de la ZP a la digestión en pronasa y a la penetración espermática que se observa tras la fecundación, al menos en el ratón (Moller y Wassarman, 1989). Tras la incubación, evaluamos la resistencia de las ZPs a ser digeridas en una solución de pronasa, observando que ni el PLG ni la PLA afectan a esta propiedad de la ZP. Por lo tanto, su posible papel en el endurecimiento post-fecundación de la ZP fue descartado.

Empleando técnicas de citometría de flujo, procedimos a evaluar tres parámetros relacionados con la funcionalidad espermática como son la viabilidad, la estabilidad del acrosoma y el grado de desorden lipídico de las membranas. El estado del acrosoma se evaluó mediante una tinción simultánea con la lectina *Arachis hypogaea agglutinin* unida a isotiocianato de fluoresceína (PNA-FITC) y yoduro de propidio (IP). En cuanto al grado de desorden lipídico, se tiñeron las muestras de espermatozoides simultáneamente con merocianina 540 (M540) y Yo-Pro 1 (YP1) siguiendo el protocolo descrito por Harrison *et al.* (Harrison *et al.*, 1996). Tanto en la especie bovina como en la porcina pudimos observar que la incubación de los espermatozoides con PLG o con PLA durante 30 minutos no tenía ningún efecto perjudicial sobre los tres parámetros evaluados, por lo que la disminución de la penetración y de la unión a la ZP no podía justificarse por fallos en la funcionalidad espermática.

Finalmente, realizamos un ensayo de unión espermatozoide-ZP empleando zonas pelúcidas aisladas de vaca y cerda y espermatozoides de toro y verraco, respectivamente. Pudimos comprobar que la PLA, añadida al medio de cultivo 30 minutos después del inicio del mismo, provocaba la liberación de los espermatozoides que, antes de añadirla, se habían unido a la ZP en ambas especies. Este resultado nos llevó a la conclusión de que el mecanismo por el cual la PLA provocaba el efecto observado en la fecundación consistía en la rotura de las uniones espermatozoide-ZP previamente establecidas, conclusión que pudimos corroborar empleando un sistema de observación videomicroscópica en tiempo real. Mediante este sistema, comprobamos que, en ovocitos control, era prácticamente imposible separar de la ZP los espermatozoides que estaban firmemente unidos a ella. Sin embargo, cuando se vertía una solución de PLA en las proximidades de estos mismos espermatozoides, un ligero contacto con la pipeta de microinyección los desprendía de su unión a la ZP.

El conjunto de evidencias experimentales obtenidas en el presente estudio junto a las referencias bibliográficas consultadas nos permitió proponer un modelo biológico para explicar el papel del sistema PLG-PLA en la fecundación. Este modelo supone que, ante la llegada de los primeros espermatozoides a la ZP, la activación del PLG de esta microrregión y su posterior conversión en PLA facilitarían, mediante proteólisis focalizada, el paso de los espermatozoides que llegaran más tarde a través de la zona. En este sentido, el sistema PLG-PLA facilitarían el proceso de fecundación. Sin embargo, el contacto del primer espermatozoide con el oolema provocaría una descarga masiva de activadores de PLG procedentes del ovocito que, tras la correspondiente generación de PLA, provocarían la rotura de las uniones espermatozoide-ZP ya establecidas,



disminuyendo de este modo la entrada de espermatozoides adicionales al espacio perivitelino. Mediante este segundo mecanismo, por tanto, el papel del sistema PLG-PLA en la fecundación estaría relacionado con la regulación de la polispermia. La identificación de los lugares específicos de corte para la PLA que mediarían uno y otro efecto, así como de los activadores concretos implicados en cada proceso constituiría el objeto de futuras investigaciones.

# Summary

## Summary

## 2. SUMMARY

The plasminogen system, better known as the fibrinolytic system for its role in the lysis of the blood clots, is involved in processes of tissue remodelling and cellular migration such as pathogen and tumour cell invasion (Danø *et al.*, 1985; Ossowski *et al.*, 1973), angiogenesis (Rifkin *et al.*, 1983), or trophoblast invasion (Sappino *et al.*, 1989). It is an overlapped system conformed by different activators and inhibitors participating, at the same time, in different intracellular signaling cascades (Binder *et al.*, 2007).

The central component of the system is the inactive zymogen plasminogen (PLG), mainly synthesized in the liver (Raum *et al.*, 1980), but described also in the seminiferous tubules (Saksela and Vihko, 1986). PLG is activated into plasmin (PLA) by the cleavage of a single peptidic bond by one of its activators, the tissue-type plasminogen activator (tPA) or the urokinase-type plasminogen activator (uPA). Both of them belongs to the serin-protease family.

The first activator, tPA, is mainly synthesized by the endothelial cells (Danø *et al.*, 1985) and it is abundant in human plasma (Collen, 1987). Receptors for tPA has been described in the surface of a variety of cells involved in different functions. Most of these receptors bind also PLG, enhancing its conversion into PLA in an efficient and focused way on the cell surface. They then contribute to the regulation of fibrynolysis and degradation of proteins either on the membrane or on the extracellular matrix (ECM).

The second activator, uPA, is a protein mainly secreted by endotelial and epithelial cells in the excretory ducts of the body (such as the renal tubules) and was initially described in ovarian carcinoma cell cultures (Astedt and Holmberg, 1976). The binding of uPA to its membrane receptor, uPAR, increases its biological effects, whether or not dependent proteolysis (Andreasen *et al.*, 1997; Sabapathy *et al.*, 1997; Shapiro *et al.*, 1996).

Once the PLA is formed by the activation of PLG, it exerts its proteolytic effect associated with the cell surface and, in the blood, degrades fibrin very efficiently (Collen and Lijnen, 1995). In addition, the PLA attaches to a variety of substrates and is capable of degrading different molecules that are part of the extracellular matrix (ECM) and basement membrane, such as fibronectin, laminin, vitronectin, proteoglycans and collagen (Aguilar *et al.*, 2004; Irigoyen *et al.*, 1999).

The proteolytic activity of the entire system is controlled mainly by inhibiting plasminogen activators (PAIs). These inhibitors belong to the family of serpins (serine protease inhibitors) and three types, PAI-1, PAI-2 and PAI-3 are known.

In the reproductive system, one of the most studied aspects of PLG-PLA system has been its relationship with ovulation, as it contributes to proteolytic degradation of the follicular wall to permit the release of the *cumulus*-oocyte complex (revised by Liu, 2004). It has also been showed its relationship to the dispersal of *cumulus* cells (D'Alessandris *et al.*, 2001), spermatogenesis (Clermont, 1972; Vihko *et al.*, 1984), sperm motility and acrosome reaction (Hong *et al.*, 1985; Taitzoglou *et al.*, 2003; Taitzoglou *et al.*, 2004) or implantation (Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983).

However, the ratio of PLG-PLA system with fertilization is not clarified today. Although over the years it has been demonstrated the presence of some of the components of the PLG-PLA in the gametes (Huarte *et al.*, 1987a; Huarte *et al.*, 1985) and in the mammalian oviduct (Kouba *et al.*, 2000a) the specific role this system plays in fertilization, if it plays any, is to be determined. Therefore, the main objective of this study was to determine whether PLG-PLA system affects the process of fertilization and, if so, identify system components involved in this effect and the mechanism by which they operate .

In the first part of our experimental work we decided to use the technique of *in vitro* fertilization (IVF) to study the effect of PLG and PLA on the fertilization process, as this is the available tool closer to physiological fertilization. As experimental model we chose the bovine and porcine species. Both are very different in IVF performance because, while in the first, the number of sperm penetrating each oocyte is usually close to one, the second is characterized by high polyspermy penetration rate obtained when using IVF (Coy *et al.*, 2008). Therefore, we decided to use both models in parallel in those cases in which the experiment could provide some doubt concerning the observed effect might depend on the number of sperm penetrated per oocyte.

From ovaries gathered in slaughter house, we proceed to the obtaining and *in vitro* maturation of cow and pig oocytes. These oocytes were *in vitro* fertilized with spermatozoa of bulls and boars of proven fertility that were selected by means of density gradients previously. Using PLG addition to culture media, studies were realised dose-effect (different concentrations of PLG) and time-effect (PLG addition 30 minutes before, 30 minutes later, or at the same time as the spermatozoa were added to the media that contained the oocytes) during the bovine and porcine IVF. The results were evaluated after

18-20 hours of the beginning of the culture. It was verified that the addition of PLG to the culture medium made difficult, in general terms, the entrance of spermatozoa into the oocytes and diminished the number of spermatozoa that remained attached to the ZP after that time. This effect was more noticeable when PLG was added 30 minutes after adding the spermatozoa to the plate containing the oocytes than if it was added 30 minutes before. In addition, the effect was more evident the whichever greater one was the tried dose of PLG, and resembled to the effect caused when PLA in similar concentrations was added directly. Therefore, we deduced that the PLG added to the medium was activating to PLA under our experimental conditions and that this PLA was, in last term, the responsible factor for the observed effect.

Due to the fact that no PLG activator had been added in the culture medium employed for IVF, we came to the conclusion that activators should proceed necessarily from the gametes and that should be released during the time that they remained in culture.

Once we verified that PLG-PLA system had a role in the fertilization, techniques of indirect immunofluorescence were used in the second part of this study to detect the presence of PLG and their activators (tPA and uPA) in the bovine and porcine oocytes. We did not try to detect these activators in the spermatozoa because sufficient previous studies already existed demonstrating their presence (Huarte *et al.*, 1987a; Smokovitis *et al.*, 1992). Nevertheless, in the case of the oocyte, we had only found two references in the bibliography in which its relation with the PLG had been detected: one in the mouse, in which Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993) demonstrated that the oocytes were able to bind PLG molecules, and another one in hamster, in which Jiménez Díaz *et al.* (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002) detected the presence of PLG in ZP and membrane of oocytes by indirect immunofluorescence techniques.

For the detection of the PLG in the oocytes, an indirect technique in two layers was used. A policlonal commercial antibody anti-PLG produced in rabbit was used as primary antibody and a secondary anti-rabbit antibody conjugated to TRITC (isotiocyanate of tetramethyl rodamin) was added to visualize the labelling in the confocal microscope. For the detection of both PLG activators indirect immunofluorescence again, but in this occasion in three layers, was used. Policlonal commercial antibodies anti-tPA and anti-uPA produced in goat were used as primary antibodies. Later, a secondary anti-goat antibody produced in rabbit and a tertiary anti-rabbit antibody conjugated again to TRITC were used.

The obtained results demonstrated that the PLG is located in the ZP and near oolema of the bovine and porcine oocytes, and that both tPA and uPA are present in both locations before the fertilization. Nevertheless, once fertilized, the oocytes lost most of the signal for PLG and the activators near oolema. In the ZP, also the signal for the PLG and their activators fell after the fertilization, being circumscribed normally to the sites where bound spermatozoa were observed. These results indicated that the system, somehow, should be activated during the spermatozoon-oocyte interaction and should bring about the effect that we had observed in the first part of the study, although was to find out how it exerted such effect.

For this reason, in the third part of the present work, diverse experiments were realised with the purpose of to describe, at least partially, the mechanism by which PLG-PLA system brought about the effect observed in the fertilization. In order to evaluate if this system, as it had been suggested (Zhang *et al.*, 1992) was involved in the post-fertilization ZP hardening described in the mouse (Moller and Wassarman, 1989), we came to incubate bovine and porcine oocytes in presence or absence of PLG and PLA. The post-fertilization hardening means the increase of the resistance of the ZP to pronase digestion and to sperm penetration. This increase is observed after the fertilization, at least in the mouse (Moller and Wassarman, 1989). After the incubation, we evaluated the resistance of the ZPs to be digested in a pronase solution, observing that neither PLG nor PLA affect this property of the ZP. Therefore, its possible role in the post-fertilization hardening of the ZP was discarded.

Using flow cytometry, we came to evaluate three parameters related to the sperm functionality as the viability, the acrosome stability and the degree of membrane lipidic disorder. The acrosome was evaluated by means of a simultaneous staining with the lectin *Arachis hypogaea agglutinin* together with fluorescein isotiocyanate (PNA-FITC) and propidium iodide (IP). As far as the degree of lipidic disorder, the samples of spermatozoa were dyed simultaneously with merocianine (540 M540) and I-Pro 1 (YP1) following the protocol described by Harrison *et al.* (Harrison *et al.*, 1996). As much in the bovine species as in the porcine one we could observe that the incubation of the spermatozoa with PLG or PLA during 30 minutes did not have any detrimental effect on the three evaluated parameters, reason why the decrease of the penetration and the ZP binding could not be explained by failures in the sperm functionality.

Finally, we realised a sperm-ZP binding test using isolated ZPs from cow and pig and spermatozoa from bull and boar, respectively. We could verify that the PLA, added to the



medium 30 minutes after the beginning of the culture, brought about the release of the spermatozoa that, before adding it, had been bound to the ZP in both species. This result lead us to the conclusion that the mechanism by which the PLA brought about the effect observed in the fertilization consisted of the breakage of the sperm-ZP bindings previously established, conclusion that we could corroborate using a system of videomicroscopic observation in real time. By means of this system, we verified that, in control oocytes, it was almost impossible to separate the ZP from the spermatozoa that were firmly bound to it. Nevertheless, when a solution of PLA near these same spermatozoa was spilled, a slight contact with the microinjection pipette came off them to its binding to the ZP.

The set of experimental evidences in the present study together with the consulted bibliographical references, allowed us to propose a biological model to explain the role of the PLG-PLA system in the fertilization. This model supposes that, before the arrival of the first spermatozoa to the ZP, the activation of the PLG in this microregion and its later conversion into PLA would facilitate, by means of focused proteolysis, the passage of the spermatozoa that arrived later through the zone. In this sense, PLG-PLA system would facilitate the fertilization process. Nevertheless, the contact of the first spermatozoon with oolema would cause a massive unloading of PLG activators coming from the oocyte that, after the corresponding generation of PLA, would bring about the breakage of the sperm-ZP bindings already established, diminishing in this way the entrance of additional spermatozoa to the perivitelline space. By means of this second mechanism, therefore, the role of the PLG-PLA system in the fertilization would be related to the regulation of polyspermy. The identification of the specific cleavage sites for the PLA that would mediate both effects as well as of the specific activators implied in each process it would constitute the objective for further research.

Introducción,  
**Introducción,**  
hipótesis y  
objetivos

### 3. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Al margen del indiscutible interés para la especie humana, la importancia del estudio de la fecundación en los animales se sustenta en la posibilidad de controlar, regular y mejorar la producción animal, la conservación de especies en peligro de extinción y la obtención de animales modificados genéticamente. Como ejemplo de este último aspecto, se suele considerar al cerdo la especie de elección para ser utilizado como potencial donante de órganos en xenotrasplantes y a la vaca y pequeños rumiantes para la producción de proteínas de interés farmacéutico secretadas en la leche.

Para que pueda llevarse a cabo la fecundación es necesario que los gametos masculino y femenino completen una serie de etapas previas, que culminan con el ovocito maduro y el espermatozoide capacitado (Austin, 1951; Chang, 1951) pero, a pesar de la intensa investigación en el tema, no se conocen por completo los mecanismos y las bases moleculares implicadas en la interacción espermatozoide-ovocito. Un mayor conocimiento de dichos mecanismos nos permitiría mejorar el procedimiento de fecundación *in vitro* (FIV) y mejorar la calidad y los sistemas de producción de embriones con el fin de ser empleados en el campo de la investigación básica y biomédica.

Entre otros problemas, uno de los que más afecta al rendimiento de la técnica de fecundación *in vitro* en los mamíferos es la elevada incidencia de polispermia (Coy y Avilés, 2010). En embriones de mamíferos, la polispermia supone una condición letal (Hunter, 1976) y aunque en la especie bovina ocurre entre un 10 y un 25% de los casos (Coy *et al.*, 2005; Iwasaki y Nakahara, 1990; Iwasaki *et al.*, 1989; Kawarsky *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997a), en la especie porcina, el índice de polispermia puede alcanzar un 65% (Chen *et al.*, 2007; Funahashi y Day, 1997; Funahashi y Romar, 2004; Wang *et al.*, 1998). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, esta anomalía es mucho menos frecuente y, en consecuencia, la identificación precisa de los mecanismos moleculares implicados en el control de la polispermia *in vivo* podría contribuir a la mejora de los resultados de la fecundación *in vitro*.

En la fecundación *in vivo*, el bloqueo de la polispermia es regulado por al menos cuatro mecanismos distintos descritos hasta ahora. El primero de ellos, que comienza con la entrada de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, incluye un proceso de selección de los gametos masculinos en el útero hasta alcanzar la unión útero-tubárica (Hunter, 2005; Suarez, 2007). Una vez en el oviducto, las células epiteliales en la región caudal del istmo retienen a los espermatozoides (Fléchon y Hunter, 1981; Hunter, 1981;

Hunter y Wilmut, 1984; Suarez, 1998), disminuyendo sus movimientos y prolongando así su supervivencia (Fazeli *et al.*, 2003; Suarez, 2008). Esto evita una llegada simultánea y masiva de los espermatozoides a la ampolla oviductal, donde se encuentra el ovocito.

El segundo mecanismo empieza con el contacto entre espermatozoide y ovocito, tras el que se produce un bloqueo o modificación en la zona pelúcida (ZP) llamado reacción de zona. Este mecanismo, que ha sido estudiado ampliamente, es consecuencia de la exocitosis del contenido de los gránulos corticales del ovocito cuando es activado por el espermatozoide (Barros y Yanagimachi, 1971; Braden *et al.*, 1954)

Un tercer mecanismo, de importancia no aclarada en los mamíferos de interés zootécnico, con la excepción de la coneja (Austin y Braden, 1953), es también consecuencia del contacto del espermatozoide con el ovocito, produciendo en este caso un bloqueo a nivel del oolema que impide la fusión de espermatozoides adicionales (Gardner y Evans, 2006).

Finalmente, un cuarto mecanismo, recientemente descrito, consiste en la modificación de la ZP por las secreciones oviductales, haciéndola más resistente a la penetración espermática (Coy *et al.*, 2008).

Con el sistema de FIV, muchas de las condiciones que se dan *in vivo* no pueden imitarse, de modo que no todos los mecanismos de bloqueo de la polispermia descritos pueden actuar para impedirla. Así, los medios de cultivo empleados en fecundación *in vitro* carecen de gran parte de las moléculas presentes en el fluido oviductal, las barreras fisiológicas para regular el número de espermatozoides que llegan al ovocito no existen y el número de gametos masculinos que se suele emplear es muy elevado comparado con los que llegan a la ampolla en condiciones fisiológicas.

Desde hace algunos años, se ha venido sugiriendo que el sistema plasminógeno/plasmina (PLG-PLA), más conocido como sistema fibrinolítico, podría tener algún papel en la fecundación en mamíferos, aunque hasta la fecha dicho papel no ha sido clarificado por completo. Estas sugerencias se basan en el hecho de que ambos gametos parecen expresar actividades proteolíticas dependientes del plasminógeno: existen datos que demuestran que los ovocitos contienen y secretan, al menos, activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) (Huarte *et al.*, 1993; Rekkas *et al.*, 2002) y estudios que demuestran la presencia en los espermatozoides de tPA y de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) (Huarte *et al.*, 1987a; Smokovitis *et al.*, 1992).

Ambos activadores son capaces de transformar el zimógeno inactivo plasminógeno (PLG) en la proteasa plasmina (PLA) cuyo papel en otras etapas del proceso reproductivo, como la ovulación, está fehacientemente demostrado (Liu, 2004). Otro componente del sistema, el inhibidor de los activadores tipo 1 (PAI-1), también ha sido identificado en los gametos (Canipari *et al.*, 1995; Liu, 2007). Dado que, además, el PLG es un componente habitual del suero sanguíneo y de otros fluidos extracelulares, y que ha sido detectado en diversas regiones del aparato genital femenino como el útero o el ovario, la mayoría de los autores asumen que está también presente en el fluido oviductal y, por lo tanto, sería interesante averiguar si su presencia en los medios de cultivo empleados para la fecundación *in vitro* podría contribuir a mejorar su eficacia al acercarlos más a las condiciones fisiológicas. Aunque existen ya algunos estudios en esta línea, ofrecen resultados contradictorios y no han sido lo suficientemente profundos como para determinar con precisión cuál es el papel del sistema PLG-PLA en la fecundación y cuál es su mecanismo de acción. En el presente estudio nos proponemos averiguarlo, para lo cual planteamos la hipótesis y objetivos que a continuación se refieren.

Este trabajo parte de la **hipótesis** de que el sistema plasminógeno/plasmina tiene una función aún no descrita en el proceso de fecundación, ya que existen datos científicos que han demostrado la presencia de varios de sus componentes (uPA, tPA, PAI, PLG, PLA) en el lugar de la fecundación y/o en las células que intervienen en ella. Proponemos también que para que se lleve a cabo esta función es necesario que el plasminógeno presente en los propios gametos o en el ambiente que los rodea (fluido oviductal en condiciones fisiológicas o medio de cultivo en condiciones de laboratorio) se transforme en plasmina. Además, sugerimos que los activadores que intervendrían en la conversión del plasminógeno en plasmina en este escenario serían liberados por los gametos tras su interacción o activación.

Para la comprobación de estas hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos**:

1. Describir el papel del sistema plasminógeno/plasmina en la fecundación bovina y porcina
2. Localizar al plasminógeno y a sus activadores en los ovocitos bovinos y porcinos
3. Identificar parcialmente el mecanismo de acción del sistema plasminógeno/plasmina en la fecundación

Revisión bibliográfica  
**Revisión bibliográfica**



## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Fecundación

La fecundación se define como el proceso mediante el cual dos células altamente diferenciadas (ovocito y espermatozoide) con dotación cromosómica haploide ( $n$ ) van a interactuar, unirse y activarse mutuamente para producir un cigoto con dotación cromosómica diploide ( $2n$ ). En el presente estudio, vamos a intentar aportar nuevos datos relacionados con las moléculas que regulan o afectan a este proceso. Concretamente, se pretende definir, como hemos comentado en el apartado anterior, el papel que juega el llamado sistema fibrinolítico sobre la interacción espermatozoide-ovocito. El sistema fibrinolítico, presente en la sangre y otros tejidos orgánicos, tiene como principales componentes al zimógeno plasminógeno, a sus activadores e inhibidores y al producto de su activación, el enzima plasmina. Algunos de estos componentes han sido identificados en el oviducto o en los gametos alrededor del momento de la fecundación. Por este motivo, la presente revisión se centrará en los acontecimientos que ocurren en esta localización espacio-temporal, es decir en el oviducto de las especies objeto de estudio (bovina y porcina) en el momento en que se produce la interacción entre los gametos masculino y femenino. No obstante, cuando sea necesario para una mejor comprensión de los hechos, se harán breves referencias a etapas o situaciones anteriores que sean determinantes para explicar los mecanismos objeto de revisión.

#### 4.1.1. El ovocito

En los mamíferos, el ovocito es una célula haploide, producida por el ovario, portadora del material genético y apta para ser fecundada por un espermatozoide.

Es necesario conocer los cambios que se producen en el ovocito desde que es una célula germinal hasta que alcanza el estadio de metafase II (MII) y adquiere la capacidad de ser fecundado, para poder comprender los mecanismos fisiológicos relacionados con el proceso de fecundación.

#### 4.1.1.1. El ovocito en el folículo preovulatorio

La relación anatómica existente entre el folículo y el ovocito en mamíferos se describió por primera vez a mediados del siglo XIX pero no fue hasta principios del siglo XX cuando se logró un avance significativo en el conocimiento de la fisiología del ovario, estableciéndose las relaciones entre el ovocito y el desarrollo folicular (Pincus, 1936). No es el objetivo de nuestro estudio revisar en detalle los procesos de foliculogénesis y ovogénesis, por lo que nos limitaremos a mencionar algunas características del ovocito ya detenido en la profase I de la meiosis, en el interior del folículo en crecimiento. Para llegar a este momento, las células germinales primordiales presentes en el ovario del embrión se han dividido por mitosis hasta convertirse en ovogonias ( $2n$ ). Estas células se dividen por meiosis para convertirse en ovocitos primarios ( $n$ ) quedando su núcleo detenido, como hemos dicho, en estadio de diplotene difuso (dictiatio) de la profase de la primera división meiótica, en lo que se conoce como “primera detención de la meiosis”. De este modo permanecen en el interior de los folículos primordiales (en un número de cientos a miles, dependiendo de la especie) de los ovarios de las hembras en el momento del nacimiento. Como veremos a lo largo de esta revisión, una vez alcanzada la pubertad, algunos de estos folículos serán reclutados para desarrollarse y finalmente ovular. De este modo, en cada ciclo estral, se originarán ondas sucesivas de crecimiento y regresión de folículos antrales conduciendo a algunos de ellos a convertirse en folículos dominantes y posteriormente en preovulatorios, constituyendo este proceso lo que se define como dinámica folicular (Fortune, 1994).

El folículo es la unidad funcional del ovario y desempeña dos papeles importantes: el de proveer el microambiente adecuado para el crecimiento y maduración del ovocito y el de la síntesis de hormonas esteroideas y proteicas. En algunas especies, existen evidencias de que los estadios iniciales del crecimiento folicular ocurren de forma muy lenta, mientras que los estadios después de la formación del antro folicular son mucho más rápidos. Así pues, según la especie, existe un número de folículos específico que será seleccionado para crecer y llegar a ser folículo dominante. En algunos animales (rata, primates hembra y cerda) los folículos dominantes se desarrollan sólo durante la fase folicular del ciclo estral y éstos serán los destinados a la ovulación. En otros animales (vaca, oveja y yegua), el reclutamiento folicular, la selección y la dominancia folicular ocurren a intervalos regulares durante todo el ciclo, pero sólo el folículo dominante presente durante la fase folicular del ciclo será el que finalmente ovule (revisado por Fortune, 1994). Solamente alrededor del 0.05% del número inicial de folículos antrales alcanzan el estadio preovulatorio, el resto regresan y se atresian (Nuttinck *et al.*, 1993).

La selección de folículos, que producirán ovocitos maduros listos para ovular en cada ciclo estral, viene dada por la expresión de receptores de la hormona luteinizante (LH) en las células de la teca y de la hormona folículo estimulante (FSH) en las células de la granulosa. Al inicio del desarrollo folicular, los receptores de la FSH sólo están presentes en las células de la granulosa y aumentan su número en la fase de crecimiento folicular. Al final de esta fase, las células de la granulosa adquieren también receptores para la LH (Foxcroft y Hunter, 1985). La FSH actúa sobre las células de la granulosa desencadenando la expresión de genes que codifican diferentes factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y en la producción de péptidos, los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular. Al mismo tiempo, y de manera sincronizada, la LH estimula las células de la teca dando lugar a la producción de andrógenos que posteriormente serán transformados en estradiol por las células de la granulosa. Estas células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal, y las células del *cumulus oophorus* (CCO) que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito permaneciendo así hasta la ovulación (revisado por Canipari, 1994).

La descarga preovulatoria de LH se produce pocas horas antes de la ovulación y es la responsable de la maduración ovocitaria. Para su mejor estudio, la maduración se ha dividido clásicamente en maduración nuclear y maduración citoplasmática (Hyttel *et al.*, 1986). Durante estos procesos, el ovocito sufre todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente. Estos cambios nucleares y citoplasmáticos ocurren, como veremos, en periodos de tiempo distintos según la especie.

En cuanto a la maduración nuclear, como hemos comentado, los ovocitos permanecen en arresto meiótico en el interior del folículo hasta que son estimulados durante la pubertad por el pico preovulatorio de la LH. Cho *et al.* (Cho *et al.*, 1974) fueron los primeros en proponer que la detención meiótica dependía de altos niveles intraovocitarios de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Posteriormente se descubriría que el AMPc era sintetizado por las CCO y transferido al ovocito vía poros de unión o *gap junctions* por lo que era posible que las CCO promovieran la síntesis de AMPc dentro del ovocito (Dekel y Kraicer, 1978). Además de la reanudación de la meiosis, el pico de LH desencadena otras transformaciones dentro del folículo, como son cambios en la esteroidogénesis folicular y en el complejo *cumulus*-ovocito. La expansión o mucificación del *cumulus* (Eppig, 1979) conlleva una separación entre las células, debido a la

deposición de ácido hialurónico en la matriz intercelular (Salustri *et al.*, 1992) y a los bajos niveles del factor sérico inhibidor de la tripsina inter- $\alpha$  (Chen *et al.*, 1994). Con la expansión se reduce el número de uniones intercelulares (*gap junction*) entre las células granulosa y entre éstas y el ovocito originando una interrupción del transporte de nutrientes, productos del metabolismo e iones (Thibault *et al.*, 1987). En la especie bovina, la expansión del *cumulus* se inicia a las 10-12 horas del inicio de la maduración y alcanza su máximo a las 18 horas (Hyttel *et al.*, 1986). En la especie porcina, la expansión se inicia a las 16 horas del pico preovulatorio de gonadotropinas (Eppig, 1979).

La pérdida de *gap junctions* hace que el flujo de AMPc desde las CCO hacia el ovocito descienda por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración o de la metafase (MPF) y el ovocito reanuda la meiosis. Así pues, se suceden las distintas fases meióticas y el característico aspecto del núcleo en profase I (vesícula germinal) desaparece. Sin embargo el ovocito no completará la meiosis, sino que volverá a quedar detenido en estadio de metafase de la segunda división meiótica, en lo que conocemos como “segunda detención de la meiosis”. Por tanto en la mayoría de las especies, incluida la bovina y la porcina, el ovocito es ovulado en metafase con el primer corpúsculo polar (CP) extruido.

El tiempo necesario para completar la maduración nuclear varía con la especie. En la vaca, la ovulación ocurre unas 18-24 horas después del pico de LH (Dieleman *et al.*, 1983) y, según algunos autores, el ovocito completa en este período de tiempo su maduración, tanto nuclear como citoplasmática (Kruip *et al.*, 1983). De este modo, entre las 3 y 6 horas del inicio de la maduración comienzan los cambios en el núcleo del ovocito que culminan con la desaparición de la vesícula germinal (VG). A las 12-16 horas se alcanza el estadio de metafase I (Xu *et al.*, 1986) y entre las 19-24 horas se produce la extrusión del primer CP al espacio perivitelino (EPV), llegando rápidamente al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis, en espera de que ocurra la fecundación (Hyttel *et al.*, 1989; Hyttel *et al.*, 1986; Sirard, 1989; Xu *et al.*, 1986). Por su parte, según distintos autores, la ovulación en la especie porcina ocurre a las 36-40 horas (Geisert, 1999) ó 38-42 horas (Du Mesnil Du Buisson *et al.*, 1970) del pico de LH. Según Motlik y Fulka (Motlik y Fulka, 1976), 20-24 horas después del pico de LH desaparece el nucleolo, la cromatina se condensa formando una red de unidades bivalentes y se produce la rotura de la VG. Estudios de fusión celular entre el núcleo y el citoplasma realizados durante el periodo anterior a la VG sugieren que los factores relacionados con la maduración (MPF *like factors*) alcanzan sus máximos niveles en los ovocitos a las 8-16 horas después del inicio de la misma (Motlik y Fulka, 1976). El estadio de metafase I se

alcanza aproximadamente a las 26-35 horas, completando la anafase y telofase I muy rápidamente y alcanzando el estadio de metafase II a las 36-40 horas del pico de LH.

Así pues, la maduración nuclear es un término claro y bien delimitado que abarca los cambios nucleares que se inician en estadio de profase I y finalizan al alcanzar la metafase II. Sin embargo, la maduración citoplasmática es un término más amplio, con límites menos claros y que comprende toda una serie de acontecimientos, que no están directamente relacionados con la progresión de la meiosis, pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores (Abeydeera, 2002). La maduración del citoplasma comprende principalmente cambios en las distintas organelas ovocitarias como son el agrupamiento de las mitocondrias (Thibault *et al.*, 1987), la migración de los gránulos corticales hacia la periferia del ovocito y el agrupamiento del retículo endoplásmico liso y rugoso en cisternas de gran tamaño (Cran y Cheng, 1985). Igualmente, aparece una reordenación de los microtúbulos debido a la intensa actividad cromosómica (Hyttel *et al.*, 1986; Moor *et al.*, 1990). Durante la maduración citoplasmática, se ha descrito también la reprogramación de la síntesis de proteínas como el factor de crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF), que será fundamental para la formación del pronúcleo tras la fecundación (Thibault *et al.*, 1975). Según algunos autores, los cambios citoplásmicos en la especie bovina no se completan hasta las 30 horas del inicio de la maduración, aunque la maduración nuclear finaliza a las 24 horas como ya hemos indicado (Hyttel *et al.*, 1989). Por su parte, la maduración citoplasmática del ovocito porcino finaliza unas 36-40 horas después del pico de LH (Hunter, 1988). Todos los cambios acontecidos en el ooplasma serán necesarios para el progreso de la maduración y el bloqueo de la polispermia (Thibault *et al.*, 1987).

#### 4.1.1.2. La ovulación

La ovulación se desencadena por el pico preovulatorio de LH, inducido a su vez por los altos niveles de estradiol que se alcanzan en los folículos preovulatorios. La LH también estimula la luteinización de las células de la pared interna de los folículos ovulados transformando las células productoras de estrógenos a productoras de progesterona, principal hormona esteroidea producida por el cuerpo lúteo tras la ovulación.

Los bóvidos son los únicos entre los animales domésticos en los que la hembra ovula entre 10-12 horas después del final de la fase de reflejo de inmovilización, es decir unas

30 después de iniciado el estro. En la especie porcina, la ovulación dura entre 1-3 horas y suele tener lugar 30-40 horas después del inicio del estro aunque algunos autores sugieren que el comienzo de la ovulación es posterior (38-42 horas), debido a que tanto el inicio como la duración de la ovulación pueden variar ampliamente (Flowers y Esbenshade, 1993).

En la vaca, el tamaño del folículo dominante es de unos 12 mm llegando a los 15 mm en el caso del folículo preovulatorio (Mann *et al.*, 2007). En la cerda los folículos preovulatorios tienen 7-11 mm de diámetro (Hunter, 1967). Antes de la ovulación, las tensas paredes de los folículos preovulatorios se tornan pendulantes y flácidas como consecuencia de una disminución de la presión intrafolicular. Con el avance del proceso ovulatorio, las CCO se desligan de la pared folicular y finalmente los complejos *cumulus*-ovocito (COCs) son liberados. El número de COCs ovulado en cada ciclo es variable; en la especie bovina la mayoría de ovulaciones son simples y sólo el 28% son dobles (Mann *et al.*, 2007). En la especie porcina el número de folículos ovulados varía entre 10-24 (Hunter, 1967). Como hemos comentado, en estas especies los ovocitos se ovulan en estadio de MII, rodeados por las CCO y por un líquido folicular viscoso.

En cuanto a los mecanismos concretos por los que se produce la ovulación, es sabido que el pico de LH estimula los folículos preovulatorios mediante una cascada de enzimas proteolíticas incluyendo los activadores del plasminógeno (PAs), la plasmina (PLA) y metaloproteasas de la matriz (MMP). Estas enzimas ocasionan una degradación de la matriz perifolicular, especialmente la desintegración de la red de fibras de colágeno que proporciona la resistencia de la pared folicular. A mediados de los años 70, se demostró en ratas que los PAs eran los responsables de la rotura de la pared de los folículos durante la ovulación (Beers, 1975; Strickland y Beers, 1976). Estudios posteriores demostraron que las células de la granulosa de rata producen activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) y activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) (Ny *et al.*, 1985) y que, en las células de la granulosa, la actividad del tPA aumenta con el desarrollo folicular, alcanzando su máximo antes de la ovulación y disminuyendo después de la misma (Liu *et al.*, 1987b; Liu *et al.*, 1991). Los cambios vasculares, como el aumento en el flujo sanguíneo folicular, y el marcado aumento en el volumen folicular, junto con las actividades proteolíticas, culminan con la rotura de la pared del folículo (Tsafiriri y Reich, 1999).

#### 4.1.1.3. El ovocito en el oviducto

En los mamíferos, el oviducto proporciona el microambiente necesario para la captura, transporte y maduración de los ovocitos ovulados; el transporte, almacenamiento y capacitación de los espermatozoides; la fecundación y finalmente, las primeras divisiones del embrión. Este microambiente propicio se debe a las características especiales de la superficie celular del oviducto y al fluido oviductal.

En el momento de la ovulación, las fimbrias envuelven al ovario y el infundíbulo captura los ovocitos recién ovulados y rodeados de las CCO (Talbot y Dicarlantonio, 1983), recogiendo adicionalmente un pequeño volumen de fluido folicular denso y viscoso (Leese, 1988). La captación de los ovocitos se produce en virtud del movimiento de los cilios y de la adhesión de las CCO al epitelio oviductal (Norwood *et al.*, 1978). Los cilios conducen a los COCs rumbo a la ampolla oviductal a través de la cual son transportados hacia el lugar de fecundación, en la unión ampular ístmica, donde esperarán la llegada de los espermatozoides. La meiosis del ovocito sólo se reanuda si se produce la fecundación, liberándose en ese momento el segundo CP, señal de que las dos divisiones del proceso meiótico se han completado.

##### 4.1.1.3.1. Vida media y envejecimiento

La vida media del ovocito se define como el tiempo, tras la ovulación y el paso a través del oviducto, durante la cual el gameto femenino permanece con la capacidad de poder ser fecundado por un espermatozoide y convertirse en un embrión viable.

Los ovocitos madurados *in vivo* se localizan en el oviducto poco después de la ovulación, ya que el intervalo entre la ovulación y la fecundación es un corto periodo de tiempo (8-12 horas), pasado el cual los ovocitos pueden sufrir divisiones partenogénicas espontáneas (Hafez *et al.*, 2002). Tras la ovulación, y una vez en el oviducto, las CCO desaparecen más o menos rápidamente dependiendo de los casos: muy rápidamente en la vaca y la cerda; después de varias horas en la coneja, pequeños roedores y primates; y en más de 24 horas (incluso después de la fecundación) en la gata, indicando que *in vivo* las CCO podrían tener un rol diferente dependiendo de la especie (Thibault y Levasseur, 1988). Según Hunter (Hunter, 1982), los COCs bovinos tienen una vida limitada tras la ovulación de 20-24 horas, y deben de entrar en contacto con los espermatozoides inmediatamente después de la misma o en las 10-12 horas siguientes a la ovulación. Los ovocitos porcinos comienzan a degenerar a las 6-8 horas postovulación.

El período de vida “funcional” o viabilidad del ovocito varía con el grado de madurez del mismo en el momento de ser ovulado y con la composición del fluido oviductal en la luz del oviducto. Otros factores que influyen en la vida media del ovocito son de tipo ambiental (estación del año, temperaturas ambientales, consideraciones nutricionales, diversos factores de estrés), la raza o linaje del animal dentro de una especie y modificaciones del ambiente hormonal como puede ser la sincronización artificial del ciclo estral.

La calidad de los ovocitos se determina por el potencial de desarrollo del embrión después de la fecundación (Wang y Sun, 2006) y para que éste sea máximo los ovocitos ovulados detenidos en estadio de MII deben fecundarse en una ventana de tiempo óptima que varía según la especie (Austin, 1974). Si la fecundación no ocurre dentro de este tiempo, los ovocitos no fecundados se someterán a un tiempo de deterioro y pérdida de su calidad, proceso conocido como “envejecimiento ovocitario”. Se ha comprobado que el éxito reproductivo disminuye si transcurre un intervalo de tiempo prolongado entre la ovulación y la fecundación. Esto es debido a que el envejecimiento provoca numerosas alteraciones morfológicas y celulares, incluyendo cambios en la estructura del oolema, la zona pelúcida (ZP), el citoesqueleto y las mitocondrias, así como la desalineación de los cromosomas, dispersión de material centrosomal, desplazamiento del primer CP e internalización o exocitosis prematura de los gránulos corticales (Díaz y Esponda, 2004; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 1986; Schatten, 2008). Además, en los animales, la fecundación de ovocitos envejecidos disminuye la tasa de preñez, el tamaño de camada y el peso de los animales al nacimiento (Huhtinen *et al.*, 1996; Tarin *et al.*, 2000).

#### 4.1.1.3.2. Transporte

Cuando se produce la ovulación *in vivo*, el ovocito sale del folículo y es recogido por las fimbrias del oviducto. Desde la ampolla oviductal, los agregados formados entre los COCs se transportan hacia la unión ampular ístmica en unos 30-45 minutos en la cerda (Hunter, 1989). Durante el transporte, y mientras llega el momento de la fecundación, se produce una maduración final del ovocito secundario debido al cambio de microambiente que experimenta al pasar del folículo al oviducto y que incluye modificaciones en el citoplasma, la ZP y el *cumulus* (Yang y Yanagimachi, 1989).

En el oviducto los COCs se desnudan, es decir, pierden su revestimiento de CCO mediante la propia acción mecánica de las contracciones musculares y, una vez alcanzados por los espermatozoides, por la acción de proteínas con actividad



hialuronidasa presentes en la cabeza espermática, como veremos más adelante. Dependiendo de la especie, los ovocitos permanecen en el lugar de la fecundación durante 24-48 horas y aquellos que han sido fecundados pasarán al útero en estadio de embriones tempranos. Se ha observado, que el transporte de los ovocitos no fecundados y fecundados (cigotos) se realiza de forma diferente según la especie. En la hembra de hámster (Ortiz *et al.*, 1986), rata (Villalón *et al.*, 1982) y vaca (Holý *et al.*, 1992), la mayoría de los cigotos se transportan rápidamente hacia el útero mientras que los ovocitos no fecundados permanecen en el oviducto donde degeneran, aunque un bajo porcentaje de ellos puede llegar al útero. En el caso de la cerda (Mwanza *et al.*, 2002), no se han observado diferencias en el transporte oviductal y tanto los ovocitos no fecundados como los cigotos entran al útero al mismo tiempo. La yegua es una de las hembras domésticas más selectivas en este aspecto: los ovocitos no fecundados son retenidos en el oviducto donde se dividen por partenogénesis y no alcanzan el útero (Betteridge y Mitchell, 1974). Parece estar claro que en el mecanismo responsable de este transporte diferenciado no interviene el perfil hormonal de la hembra ni las características fisicoquímicas del fluido oviductal, sino que es el propio ovocito o cigoto el que desencadena las señales gracias a la síntesis de moléculas derivadas de los ácidos grasos poliinsaturados (Kubagawa *et al.*, 2006).

#### 4.1.1.3.3. Maduración zonal

La zona pelúcida (ZP) es una estructura glicoproteica y porosa que, dependiendo de la especie, es secretada por el ovocito y/o las CCO durante el desarrollo folicular. La ZP está compuesta por un 70% de proteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4), un 20% de hexosas, un 3% de ácido siálico y un 2% de glicoproteínas sulfatadas (Elder y Dale, 2000). La integridad de esta estructura durante la maduración ovocitaria es vital ya que permite la disponibilidad de nutrientes necesarios, principalmente piruvato y oxalacetato, para que el proceso finalice con éxito (Brackett, 1985). La rotura prematura de la ZP conlleva la muerte del ovocito, tal y como ocurre en aquellos ovocitos destinados a la atresia.

Se ha observado que, tras la ovulación, la composición de la ZP se modifica por la adhesión de unas proteínas específicas que son sintetizadas por el epitelio oviductal, conocidas como “oviductinas” (Robitaille *et al.*, 1988). La síntesis y secreción de algunas de ellas está controlada hormonalmente, siendo específicas de distintas fases del ciclo estral (Buhi *et al.*, 1989). Buhi *et al.* (Buhi *et al.*, 1993) identificaron tres glicoproteínas estrógeno-dependientes en la ZP, el EPV y el oolema de ovocitos porcinos. La adhesión a

la ZP de estas glicoproteínas oviductales podría modificar los sitios de unión del espermatozoide, influyendo en el reconocimiento y unión de los gametos.

Así, recientemente se ha demostrado que en la cerda y en la vaca, la ZP experimenta un endurecimiento en el oviducto que aumenta su resistencia a la digestión proteolítica y a la entrada de espermatozoides. Este endurecimiento está regulado por la glicoproteína oviductina (OVGP1) secretada en el oviducto de forma específica en las distintas fases del ciclo estral (Coy *et al.*, 2008a). Estos autores han descrito que la OVGP1 junto con la heparina regula la interacción del espermatozoide con la ZP y contribuye a la regulación de la polispermia en la especie porcina. Además de este reciente hallazgo, es evidente que el oviducto ejerce un papel en la maduración zonal del ovocito ya que son numerosos los estudios que indican diferencias significativas entre la ZP de los ovocitos ovulados y los madurados *in vitro*. Por ejemplo, el diámetro y grosor de la ZP porcina es menor en ovocitos madurados *in vitro* y su superficie externa es más compacta y lisa y con más poros que la de ovocitos ovulados (Funahashi *et al.*, 2000).

Además de estas observaciones, podrían existir otros cambios en la ZP que contribuyan a su maduración final pero que aún no hayan sido descritos ya que el oviducto proporciona un ambiente dinámico y el fluido oviductal tiene una composición compleja y variable con el ciclo estral. Por ejemplo, se sabe que este fluido tiene actividad enzimática para distintas glicosidasas (Carrasco *et al.*, 2008a; Carrasco *et al.*, 2008b) que podrían modificar azúcares que participan en la interacción COC-células oviductales o COC-espermatozoide.

#### **4.1.2. El espermatozoide**

En los mamíferos, el espermatozoide es la única célula diseñada para abandonar el organismo y así poder completar su función biológica de unión al ovocito maduro durante la fecundación, dando lugar a un cigoto. Puesto que el presente trabajo se centra en el proceso de fecundación, iniciaremos la revisión del gameto masculino una vez ha sido eyaculado, obviando los procesos de espermatogénesis y maduración espermática en el epidídimo.

El espermatozoide maduro cuenta con tres regiones altamente especializadas: la cabeza, involucrada en la interacción espermatozoide-ovocito; la pieza intermedia, encargada de la producción de energía, y el flagelo, encargado de la motilidad. En la

cabeza espermática se distinguen a su vez cuatro regiones: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial. El acrosoma, una gran vesícula secretora, se sitúa apicalmente al núcleo (Figura 1.1 A).

#### 4.1.2.1. Capacitación espermática (CA) y reacción acrosómica (RA)

Los espermatozoides recién eyaculados no poseen la capacidad de fecundar al ovocito, sino que para poder adquirir esta capacidad fecundante deben pasar un tiempo en el tracto reproductor femenino y sufrir un conjunto de cambios que les permitan culminar el proceso de fecundación. Esta observación fue descubierta en 1951, de forma independiente, por Austin y Chang (Austin, 1951; Chang, 1951) y, un año más tarde, Austin bautizó a este conjunto de cambios como capacitación espermática (CA) (Austin, 1952).

A las observaciones de Austin y Cran mencionadas, les siguieron numerosos experimentos sobre los cambios que sufrían los espermatozoides de mamíferos durante la CA (Bedford, 1970; Chang, 1957; Sidhu y Guraya, 1989). Aunque hoy día los cambios moleculares no son bien conocidos, se acepta que la CA es un proceso secuencial que involucra numeros pasos como la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide, alteraciones en las concentraciones intracelulares de iones, cambios en el potencial de membrana y fosforilación de proteínas; pero en el que el espermatozoide no sufre cambios morfológicos (revisado por Vadnais *et al.*, 2007). Una vez capacitado, el espermatozoide que contacte con el ovocito sufrirá la reacción acrosómica (RA) que sí implica un cambio morfológico ya que, como veremos más adelante, conlleva un proceso de fusión de membranas por el que se libera el contenido acrosomal y el gameto masculino pierde el acrosoma. Mientras que la CA es un proceso reversible, la RA no lo es, por lo que una vez el espermatozoide inicia la RA, el acrosoma no puede restaurarse (Flesch y Gadella, 2000).

*In vivo*, la CA se produce durante el paso de los espermatozoides por el tracto genital femenino y se sabe que aunque puede tener lugar en el útero (Austin, 1951), este proceso se produce más rápidamente cuando sucede en el oviducto (Bedford, 1969). Igualmente, se ha descrito que la adquisición del estado de “espermatozoide capacitado” ocurre más rápidamente *in vivo* que *in vitro*, posiblemente debido a las múltiples interacciones bioquímicas entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (Dobrinski *et al.*, 1997).

De entre todos los cambios descritos durante la CA, quizás uno de los mejor estudiados es el cambio lipídico a nivel de membrana (Flesch y Gadella, 2000). Se sabe que niveles bajos de bicarbonato (como los que aparecen en el epidídimo, Rodríguez-Martínez *et al.*, 1990a) mantienen al espermatozoide en un estado “no capacitado”, mientras que los niveles altos (como los que hay en el fluido oviductal (Vishwakarma, 1962) favorecen la CA. El  $\text{HCO}_3^-$  actúa activando la adenil ciclasa incrementando así la concentración intracelular de AMPc quien, en última instancia, activa la cascada de señalización de la proteína quinasa A (PKA). La PKA regula, entre otros, el metabolismo de los lípidos y va a producir cambios a nivel de la composición lipídica de la membrana espermática dando como resultado un aumento de la fluidez de la misma (Fraser y Dandekar, 1973; Fraser *et al.*, 2005). Entre estas alteraciones lipídicas es bien conocida la del colesterol. Estudios *in vitro* han demostrado que durante la CA se pierde aproximadamente el 30% del colesterol de la membrana espermática y un porcentaje similar de otros fosfolípidos, especialmente de fosfatidilcolina, debido principalmente a la hidrólisis de fosfoglicéridos (Zanetti *et al.*, 2010). De forma opuesta, si se aumenta el colesterol presente en la membrana espermática se puede inhibir la CA (Galantino-Homer *et al.*, 2006). Estos cambios lipídicos y de fluidez de membrana van a modificar el flujo de iones a través de la misma y como consecuencia se altera el potencial de la membrana. Así pues, se sabe que la membrana de los espermatozoides de toro se vuelve más negativa conforme la célula pierde iones  $\text{K}^+$  y esta hiperpolarización es necesaria para transmitir las señales adecuadas que desencadenarán la reacción acrosómica una vez el espermatozoide haya contactado con la ZP (Zeng *et al.*, 1995).

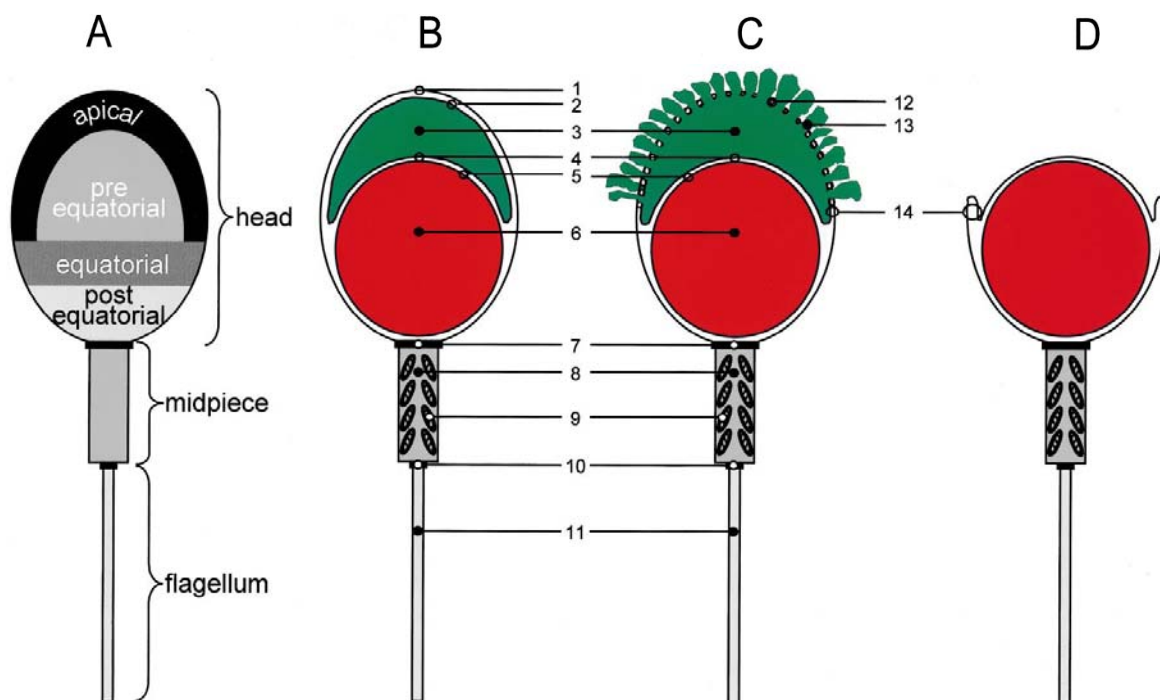
Es bien sabido que la CA es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y, tanto en la especie bovina (Handrow *et al.*, 1989) como en la porcina (Tardif *et al.*, 2003), la concentración intracelular de este ión aumenta en los espermatozoides capacitados. Esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activa la adenilciclasa con la consiguiente activación de la PKA que a su vez va a favorecer la fosforilación de distintas proteínas espermáticas. En mamíferos, la correlación existente entre capacitación y fosforilación de tirosina de determinadas proteínas espermáticas es ampliamente conocida (Leyton y Saling, 1989; Visconti *et al.*, 1995a; Visconti *et al.*, 1995b). Esta cascada de activación de distintas señales celulares vía AMPc también va a modificar el metabolismo espermático con el consiguiente aumento de la motilidad de los espermatozoides capacitados en lo que se conoce como “hiperactivación espermática” (revisado por Flesch y Gadella, 2000).

Una vez pasada la primera fase de CA, el espermatozoide capacitado (pero no reaccionado) contacta con la ZP del ovocito iniciando la reacción acrosómica (RA)

(Yanagimachi, 1994a) que implica un proceso de fusión de membranas, tal y como se describe en la figura 1.1., y que finaliza con la fragmentación y pérdida del acrosoma liberándose las enzimas hidrolíticas y proteasas de su interior (Gliedt *et al.*, 1996; Griffin y Ojeda, 1992). Este proceso excitótico permitirá al espermatozoide atravesar la ZP y fecundar al ovocito. En el apartado 4.1.3.2 describiremos este proceso de forma más detallada haciendo referencia a la controversia que existe actualmente sobre si los espermatozoides ya reaccionados tienen o no la capacidad de unirse a la ZP.

**Figura 1.1.** Esquema gráfico de los cambios sufridos durante la reacción acrosómica. Tomado de (Flesch y Gadella, 2000). **A)** Espermatozoide maduro donde se observa el flagelo, la pieza intermedia y la cabeza con las distintas regiones. **B)** Tras la unión del espermatozoide con el ovocito mediante la parte apical de la membrana plasmática, ésta se une con la membrana acrosomal externa en numerosos puntos. **C)** El contenido acrosomal (enzimas hidrolíticas) se secreta permitiendo la digestión de la ZP. **D)** Después de la reacción acrosómica, la membrana acrosomal interna queda expuesta formando un continuo con la membrana plasmática. Esta estructura en forma de horquilla será la responsable de la unión primaria entre el espermatozide y el oolema del ovocito.

**1:** membrana plasmática; **2:** membrana acrosomal externa; **3:** contenido acrosomal; **4:** membrana acrosomal interna; **5:** envoltura nuclear; **6:** núcleo con ADN altamente empaquetado; **7:** anillo posterior; **8:** pieza intermedia; **9:** mitocondrias; **10:** anillo anular; **11:** flagelo; **12:** vesícula mezclada (membrana plasmática fusionada con membrana acrosomal externa); **13:** contenido acrosomal; **14:** estructura en horquilla.



#### 4.1.2.2. Etapas finales de la capacitación en el reservorio espermático

Durante el coito, millones de espermatozoides son eyaculados, pero sólo unos pocos llegan al oviducto constituyendo un reservorio espermático. La formación del reservorio espermático se ha observado en el oviducto de oveja (Hunter y Nichol, 1983), ratona (Suarez, 1987), hámster (Smith y Yanagimachi, 1991), vaca (Hunter, 1991; Hunter y Wilmut, 1984), cerda (Fléchon y Hunter, 1981; Hunter, 1981) y mujer (Baillie *et al.*, 1997; Pacey *et al.*, 1995). Una vez en el oviducto, los espermatozoides son almacenados en la porción caudal del istmo hasta momentos antes de la ovulación (Hunter y Wilmut, 1984). El istmo, por lo tanto, es el reservorio espermático funcional (Du Mesnil Du Boisson y Dauzier, 1955). En la cerda, de los miles de millones de espermatozoides depositados durante la cubrición, sólo de cien a doscientos mil colonizan el reservorio de la unión uterotúbica en 1-2 horas. Hunter y Wilmut (Hunter y Wilmut, 1984) señalan que el tiempo de llegada hasta el lugar de la fecundación es muy variable y, en concreto, los espermatozoides de toro se pueden encontrar en dicho lugar a los 2-13 minutos tras el coito. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el lugar de deposición del semen durante la cubrición, característico de cada especie, condiciona el momento del inicio de la CA así como el tiempo requerido para completarla, que oscila de 1 a 7 horas (revisado por Vadnais *et al.*, 2007). En especies de deposición uterina (porcina y murina), la capacitación y el almacenamiento espermático se produce en el istmo oviductal (Dobrinski *et al.*, 1997). En especies de deposición vaginal (ovina, caprina y cunícola, entre otras) la CA comienza con el contacto de los espermatozoides con el moco cervical. En estos animales, las criptas presentes en el tracto cervical suponen un reservorio de espermatozoides con capacidad fecundante (Hunter *et al.*, 1980; Hunter, 1982). Se acepta que los espermatozoides requieren como media 2-4 horas en el tracto genital para sufrir la CA (Davis, 1981) y en el caso del verraco 5-6 horas (Hunter y Hall, 1974).

Los espermatozoides permanecen adheridos al epitelio oviductal hasta que los COCs ovulados se adhieren a los cilios del infundíbulo y se deslizan hasta la ampolla (Talbot *et al.*, 1999). En el momento de la ovulación, los espermatozoides capacitados e hiperactivados migran hasta la ampolla, donde se encuentran los COCs, por lo que inicio y finalización de la CA deben estar sincronizadas con la ovulación (Suarez, 2002). De acuerdo con esto, los cambios asociados con la CA espermática varían según el perfil hormonal de la hembra y, en la mayoría de mamíferos, altos niveles de estrógenos plasmáticos la favorecen mientras que concentraciones elevadas de progesterona la inhiben (Foresta *et al.*, 1992).

Una vez en el reservorio ístmico, los espermatozoides contactan con los cilios por su región apical, permaneciendo la mayoría de ellos viables (Murray y Smith, 1997; Rodríguez-Martínez *et al.*, 1990b). La detención de los espermatozoides en el reservorio se ve favorecida por la presencia de una gran cantidad de secreciones mucosas muy viscosas, ricas en mucopolisacáridos y glicoproteínas específicas, conjuntamente con una reducción de la luz del oviducto en la unión uterotúbica y el istmo provocada por el edema de la lámina propia (Hunter y Wilmut, 1984). Además, parece que existe una unión selectiva de espermatozoides al epitelio oviductal (Murray y Smith, 1997), teniendo mayor afinidad por la unión aquellos que no están capacitados (Fazeli *et al.*, 1999). Este contacto íntimo espermatozoides no capacitados-células epiteliales del oviducto es necesario precisamente para no inducir una CA prematura, prolongando así la viabilidad espermática. De hecho, se sabe que mientras los espermatozoides permanecen en el reservorio, se produce una disminución de su metabolismo, y por tanto de su motilidad, debido a las especiales condiciones físico-químicas que se dan en este lugar (Smith, 1998). Igualmente, gracias a esta unión los espermatozoides mantienen concentraciones bajas de  $Ca^{2+}$  manteniendo un estado “no favorecedor” de la CA (Dobrinski *et al.*, 1997). En respuesta a su reconocimiento en el lugar de almacenamiento, el espermatozoide modula la expresión génica del oviducto y por lo tanto el proteoma de secreción (Fazeli *et al.*, 2004; Georgiou *et al.*, 2005).

Las moléculas que median en la adhesión espermatozoide-oviducto no son del todo conocidas aunque se cree que algunas especies pueden compartir mecanismos similares. Las especies porcina y bovina son las más estudiadas al respecto y en ellas se encuentran dos grandes familias de proteínas, las espermadhesinas (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998) y las proteínas del plasma seminal bovino (BSP) (Desnoyers y Manjunath, 1992; Gwathmey *et al.*, 2003; Ignotz *et al.*, 2001), que han mostrado tener capacidad de unión a carbohidratos y heparina, quienes a su vez parecen estar implicados en la adhesión de los espermatozoides al epitelio oviductal (Manásková *et al.*, 2007). En la especie bovina, se ha identificado al trisacárido Lewis-a como el principal receptor oviductal para los espermatozoides (Suarez *et al.*, 1998) y a la proteína PDC-109 (también conocida como BSP-A1/A2) como la proteína de unión a fucosa que media la unión del espermatozoide al oviducto (Gwathmey *et al.*, 2003).

Está bien estudiado el papel de las células epiteliales sobre la CA, pero no se puede obviar el papel de las propias secreciones oviductales sobre los gametos masculinos ya que en el momento del estro se secretan proteínas específicas que afectan a la función espermática modulando el proceso de CA (revisado por Holt y Fazeli, 2010). Numerosos



estudios han valorado el efecto de las secreciones oviductales sobre la CA. King *et al.* (King *et al.*, 1994) señalaron que en el momento del estro se secreta en el oviducto una proteína que favorece la CA del espermatozoide bovino y Topper *et al.* (Topper *et al.*, 1999) comprobaron que la incubación de espermatozoides de toro con fluido oviductal aumenta los índices de CA. Entre las proteínas específicas con un efecto sobre la CA están las glicoproteínas, tanto las de alto peso molecular, como la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1; McCauley *et al.*, 2003), como las de bajo peso molecular tipo glicodelinas (Yeung *et al.*, 2009), o las proteínas tipo chaperona como la *heat shock* de 70 kDa (Lloyd *et al.*, 2009). Además, estudios recientes han demostrado que las fracciones de alto y bajo peso molecular del fluido oviductal pueden tener efectos complementarios sobre la CA (Coy *et al.*, 2010).

Una vez que se han establecido depósitos adecuados de espermatozoides dentro del aparato reproductor, y bajo una delicada y específica regulación hormonal, las células espermáticas son liberadas gracias a la hiperactivación adquirida tras la CA (Ho y Suarez, 2001), a la actividad contráctil del miometrio y mesosálpinx y a que los cambios sufridos en la cabeza espermática debidos a la CA reducen la afinidad de la unión espermatozoide-células oviductales (Fazeli *et al.*, 1999). Clásicamente, esta liberación espermática se ha descrito como un acontecimiento “gradual” (revisado por Suarez, 2008), pero recientemente Kölle *et al.* (Kölle *et al.*, 2009) observaron en la vaca que tan pronto como los COCs entran en la ampolla los espermatozoides se liberan de forma “explosiva” del epitelio migrando hacia el ovocito.

Además, existen evidencias de que en el fluido oviductal hay moléculas, como los glicoconjugados sulfatados y agentes reductores-disulfuro, que son capaces de liberar espermatozoides unidos a las células epiteliales oviductales (Gualtieri *et al.*, 2009; Talevi y Gualtieri, 2001; Talevi *et al.*, 2007). Se cree que tanto la CA como el tránsito a través de las diferentes regiones del tracto genital femenino y la estancia en los reservorios espermáticos sirven para regular el número de espermatozoides que llega hasta el sitio de la fecundación (Suarez, 1998; Yanagimachi, 1994b). En el cerdo además, el contacto de los gametos con las células epiteliales del oviducto y/o a las secreciones oviductales puede reducir la polispermia (Hunter, 1991; Wang *et al.*, 2003).

Como hemos comentado, cuando ocurra la ovulación, se producirá la activación del movimiento espermático (hiperactivación), la liberación progresiva de los espermatozoides de la mucosa del istmo y el ascenso de los mismos de forma intermitente con alternancia de periodos de adhesión (Smith y Yanagimachi, 1991; Suarez, 1987) hacia la ampolla del

oviducto. Estos últimos deben haber sido capacitados a lo largo de la fase de transporte para poder sufrir la RA una vez contacten con el ovocito y posteriormente penetrarlo.

Resumiendo, se puede decir que la CA se inicia después de la eliminación o modificación de factores adquiridos por el espermatozoide durante su contacto con el plasma seminal, continúa durante su paso a través del tracto reproductor femenino y finaliza cuando los espermatozoides interactúan con la ZP del ovocito experimentando la RA (De Jonge, 2005) que se ve favorecida por el perfil hormonal postovulatorio, con predominancia de progesterona sobre estrógenos (revisado por Witte y Schäfer-Somi, 2007). En el siguiente apartado estudiaremos más detenidamente esta interacción.

#### **4.1.3. Interacción espermatozoide-ovocito y fecundación**

La fecundación es el acontecimiento fundamental para el inicio de la vida y consiste en la unión de un ovocito con un espermatozoide. En los mamíferos, esta unión es el principio de una secuencia coordinada de interacciones celulares entre los gametos haploides que conduce a la formación del cigoto diploide, iniciando así el desarrollo embrionario.

Una vez que los espermatozoides capacitados alcanzan el lugar de fecundación, éstos tienen que atravesar las barreras que presenta el ovocito, entre las que se encuentran las células del *cumulus* que le rodean, la ZP y la membrana plásmatica.

##### 4.1.3.1. El espermatozoide a través de las células del *cumulus oophorus*

El *cumulus oophorus* está formado por un conjunto de células y una matriz extracelular (ECM) que une a las células entre sí. La ECM es rica en ácido hialurónico (Salustri *et al.*, 1992) y numerosas proteínas han sido identificadas como componentes de la misma, incluyendo el inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina, un proteinglicano sulfatado, y la proteína pentraxina 3 (Relucanti *et al.*, 2005). Como hemos mencionado, el *cumulus* que recubre a la ZP está presente en diferente medida en el momento de la fecundación en los mamíferos (Thibault y Levasseur, 1988).

Para poder atravesar las células del *cumulus*, los espermatozoides deben estar parcialmente capacitados y no reaccionados (acrosoma intacto) ya que se ha observado

en varias especies que aquéllos no capacitados y los que ya han sufrido la reacción acrosómica, aunque pueden unirse a la superficie de las células del *cumulus*, no pueden atravesarlo y únicamente los capacitados tienen capacidad para desplazarse libremente dentro del *cumulus* (Myles y Primakoff, 1997). Esta observación se contradice con la creencia inicial que suponía que el espermatozoide utilizaría las enzimas hidrolíticas de su acrosoma, liberadas tras la reacción acrosómica, para digerir el ácido hialurónico de la matriz extracelular del *cumulus* (McClean y Rowlands, 1942). Actualmente se ha descrito en la superficie del espermatozoide una proteína con actividad hialuronidasa, denominada PH-20 o SPAM-1, que sería capaz de hidrolizar el ácido hialurónico ayudando al gameto masculino a atravesar la densa capa de células del *cumulus*, junto al movimiento hiperactivo (Myles y Primakoff, 1997).

#### 4.1.3.2. Unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP)

Una vez atravesadas las células del *cumulus*, el espermatozoide tiene que unirse y atravesar la ZP. La ZP está formada por tres o cuatro glicoproteínas cuya nomenclatura (letras o números) ha cambiado con el tiempo. La ZP de ovocitos de mujer (Lefievre *et al.*, 2004) y rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005) contiene cuatro glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) mientras que la ZP de ovocitos de cerda y vaca contiene tres (ZP2, ZP3 y ZP4) que se corresponden con ZPA, ZPC y ZPB respectivamente en la antigua nomenclatura (Harris *et al.*, 1994). La ZP murina también tiene tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) (Bleil y Wassarman, 1980a). Así pues, la ZP de la especie porcina, bovina y murina tienen en común la ZP2 y ZP3 mientras que la ZP1 y la ZP4 son producto de distintos genes (Hughes y Barratt, 1999). Las glicoproteínas tienen pesos moleculares distintos (Sacco *et al.*, 1986) y diferente distribución (Hedrick y Wardrip, 1986). Estas glicoproteínas están altamente glicosiladas, lo que es muy importante para conferir a la ZP sus funciones biológicas específicas.

La unión espermatozoide-ZP está mediada por la interacción entre moléculas con gran afinidad presentes en la superficie tanto del espermatozoide como del ovocito. Existen dos tipos de uniones, la primaria y la secundaria. En la unión primaria, considerada relativamente específica de especie, la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida de la ratona (o la equivalente según la especie) se une a proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado y no reaccionado. La unión secundaria acontece tras la reacción acrosómica. En ella, el espermatozoide reaccionado permanece unido a la ZP2 gracias al enzima proacrosina que se encuentra anclada a la membrana

acrosomal interna. Los espermatozoides que no reconozcan y se unan a las glicoproteínas de la ZP sufriendo la reacción acrosómica no fecundarán al ovocito (Topfer-Petersen *et al.*, 2000). Aunque hoy en día existe cierta controversia con respecto a la capacidad de los espermatozoides reaccionados para fecundar, esta es la teoría más aceptada todavía (Wassarman, 2009).

A pesar de las numerosas investigaciones llevadas a cabo para conocer las bases moleculares de la unión espermatozoide-ZP, no existe un modelo único aceptado para los mamíferos (Dean, 2004; Rankin *et al.*, 2003). En el ratón, uno de los modelos más estudiados, se aceptaba hasta hace poco que los oligosacáridos de la ZP3 eran los responsables de la unión del espermatozoide (Bleil y Wassarman, 1980b). Sin embargo, recientemente, se han aportado datos utilizando ovocitos de ratonas mutantes para ZP2 y ZP3 observándose que, a diferencia de lo previsto, los espermatozoides penetran los ovocitos de animales mutantes con ZP3 desprovistos de oligosacáridos (Gahlay *et al.*, 2010). Por tanto, estos autores sugieren que el reconocimiento espermatozoide-ovocito depende del estatus de fragmentación de ZP2 y que la unión del espermatozoide a la superficie de la ZP no es suficiente para inducir la reacción acrosómica.

En el cerdo (Yonezawa *et al.*, 2001; Yurewicz *et al.*, 1998) y en la vaca (Yonezawa *et al.*, 2001; Yurewicz *et al.*, 1998) hay evidencias de que la ZPB (ortólogo de la ZP1 de ratón) se une al espermatozoide. Sin embargo, otros estudios evidencian el papel de las cadenas de oligosacáridos N-unidas en la unión del espermatozoide de toro y verraco a la ZP (Amari *et al.*, 2001; Nakano y Yonezawa, 2001; Yonezawa *et al.*, 2001). Además, en el caso de la especie bovina se ha demostrado la implicación del ácido siálico en la unión del espermatozoide a la ZP (Velasquez *et al.*, 2007), aunque todavía se desconoce el tipo de glicoproteína al que está unido ese ácido siálico. Actualmente se cuestionan los modelos que proponen a los oligosacáridos como responsables de la unión del espermatozoide a la ZP, en vista de los resultados contradictorios que han sido obtenidos en la última década al respecto. Alternativamente se plantea que la función de los oligosacáridos en el proceso de unión espermatozoide-ZP quedaría restringida al establecimiento de la especificidad de especie (Clark y Dell, 2006).

El modelo descrito por el grupo del Dr. Jurrien Dean propone que es la estructura supramolecular de las proteínas la que determina la unión del espermatozoide a la ZP, la cual es modificada por una proteasa liberada desde los gránulos corticales. Este modelo supramolecular se propone a raíz de los resultados obtenidos por Rankin *et al.* utilizando animales transgénicos en los que se han introducido los genes de ZP2 y ZP3 humanos

(Rankin *et al.*, 2003; Rankin *et al.*, 1998). Los resultados demuestran que, aunque ZP2 y ZP3 humana se expresan en ovocitos de ratona, los espermatozoides humanos no se unen a la ZP y los de ratón sí, incluso después de haberse producido la reacción cortical. Según este modelo la ZP, formada por ZP2 y ZP3 con una disposición tridimensional específica, sería responsable de la capacidad de unión del espermatozoide y tras la extrusión del contenido de los gránulos corticales, se produciría una proteólisis o *cleavage* de la ZP2 modificando la estructura supramolecular y provocando un cambio en la conformación espacial que impediría la unión de más espermatozoides, tal y como han descrito diferentes autores (Barros y Yanagimachi, 1971; Wolf y Hamada, 1977). En este modelo, aunque no se descarta la participación de los carbohidratos, no sería necesaria su modificación tras la fecundación. Este modelo supramolecular explicaría los resultados obtenidos con ovocitos de ratona que no poseen ZP1 y cuya ZP está compuesta únicamente de ZP2 y ZP3 la cual, aunque estructuralmente es defectuosa, continúa teniendo la capacidad de unir espermatozoides, siendo los ratones *knockout* para ZP1 fértiles (Rankin *et al.*, 1999). Sin embargo, como hemos comentado, se ha descrito recientemente que es el estado de fragmentación de ZP2 el que determina la capacidad del ovocito para unir espermatozoides a su ZP aún en el caso de que los gránulos corticales hayan sido extruidos, y no ninguna otra de las causas mencionadas (Gahlay *et al.*, 2010).

#### 4.1.3.3. Fusión de las membranas plasmáticas

Tras la reacción acrosómica (RA) y la unión secundaria a la ZP, el espermatozoide atraviesa el espesor de la ZP para alcanzar el EPV. Tan pronto como la cabeza espermática se adhiere firmemente a la superficie del ovocito, la motilidad residual del flagelo fuerza a éste a rotar dentro de la zona hasta que se incorpora totalmente al EPV, momento en que la motilidad disminuye bruscamente y la rotación cesa (Gaddum-Rosse, 1985). Según la hipótesis propuesta por O'Rand *et al.* (O'Rand *et al.*, 1986), la penetración de la ZP se conseguiría mediante la acción coordinada de las enzimas acrosomales liberadas durante la RA y la potente fuerza de empuje desarrollada por el movimiento del espermatozoide, que agita el flagelo espermático de lado a lado y la cabeza de delante a atrás.

Una vez en el EPV, la porción de membrana plasmática del segmento ecuatorial del espermatozoide se une al oolema y en este punto se inicia la fusión entre las membranas de ambos gametos (Gaddum-Rosse, 1985). Así pues, la fusión de membranas queda

restringida a regiones específicas en cada gameto, lo que podría reflejar una composición proteica, organización de lípidos o morfología de membrana determinada para esa región.

El proceso de fusión de membranas puede ser dividido en tres eventos claves. El primero consiste en el reconocimiento de membranas que implica un contacto inicial entre ambas mediado por uniones tipo proteína-proteína o proteína-carbohidrato. El segundo paso es la aposición de las membranas donde, gracias a la actividad fusogénica de las proteínas, las dos membranas realizan un contacto íntimo y se produce la adhesión y unión física de ambas a través de interacciones proteína-lípido o proteína-proteína. En este punto se produce un cambio de conformación irreversible en el que las proteínas se pliegan sobre sí mismas. El tercer evento corresponde a la mezcla de lípidos que se produce una vez las membranas entran en contacto dando como resultado una bicapa que permite la continuidad citoplasmática entre las dos células (Jahn y Grubmuller, 2002).

En el proceso de fusión está implicada una proteína presente en la membrana plasmática del espermatozoide, la fertilina (Myles y Primakoff, 1997), aunque numerosos estudios implican a varias moléculas a nivel espermático y ovocitario como responsables de la interacción. Durante los últimos quince años, se ha desarrollado un modelo que sugiere que la unión membrana espermática-oolema es el resultado de la adhesión entre las integrinas existentes a nivel ovocitario y los ligandos de estas integrinas presentes en el espermatozoide. La identificación de las proteínas específicas implicadas en este proceso es uno de los principales objetivos de numerosos proyectos de investigación (revisado por Evans, 2009).

El espermatozoide se incorpora en su totalidad (según la especie) dentro del ooplasma, la porción anterior de la cabeza se engloba por fagocitosis y la posterior junto con el flagelo se internalizan mediante fusión de membranas (Gaddum-Rosse, 1985). Las mitocondrias presentes en el flagelo espermático son degradadas por lo que sólo las mitocondrias maternas pasarán a la siguiente generación. Aunque la fusión del espermatozoide al oolema puede producirse en posición perpendicular o paralela, generalmente siempre se produce en la región central de la membrana plasmática, en la proximidad o a nivel de la región ecuatorial (Gaddum-Rosse, 1985). A nivel del oolema, se observa la presencia de microvellosidades en la mayoría de la superficie aunque en roedores, el oolema cercano a la placa metafásica no presenta microvellosidades y la fusión raramente ocurre a este nivel. La fusión de membranas entre ambos gametos desencadenará la activación del ovocito.

## **4.2. Bloqueo de la polispermia**

La penetración polispérmica, es decir la entrada en el ovocito de más de un espermatozoide, es un fenómeno anómalo en los mamíferos que origina embriones poliploides que normalmente mueren en un estadio temprano de desarrollo.

Los ovocitos de la mayoría de mamíferos han desarrollado mecanismos para prevenir la polispermia durante su desarrollo y maduración (Ducibella y Buetow, 1994; Yanagimachi, 1994b). A grosso modo, y para su mejor estudio, podríamos decir que los mecanismos para evitar la polispermia se establecen a dos grandes niveles: aquellos que se instauran antes de que se produzca la unión espermatozoide-ovocito (por ejemplo durante el tránsito de gametos en el tracto genital) y los que aparecen una vez los gametos se han fusionado. En los siguientes apartados abordaremos los distintos mecanismos explicando el peso específico que cada uno de ellos tiene en cada especie.

### **4.2.1. Mecanismos previos a la unión espermatozoide-ovocito**

4.2.1.1. Regulación por el aparato genital femenino del número de espermatozoides que alcanzan el lugar de la fecundación

Existen mecanismos en el aparato genital de la hembra, anteriores al encuentro espermatozoide-ovocito, que contribuyen al control de la polispermia. Entre estos mecanismos previos a la fecundación, está ampliamente demostrado que el número de espermatozoides depositados en el útero o la vagina se ve reducido varias veces conforme se progresa a lo largo del tracto genital femenino. De este modo, los espermatozoides menos aptos van siendo eliminados por los leucocitos (Hunter, 1990; Hunter, 1991). Finalmente, una gran parte de los espermatozoides que consiguen atravesar la barrera que supone la unión útero-tubárica quedan retenidos en el istmo del oviducto formando un reservorio tal y como hemos descrito en el apartado 4.1.2.2.

Hemos comentado que los carbohidratos presentes en la membrana apical de las células oviductales y las moléculas tipo lectina en la superficie rostral del espermatozoide son las responsables de la adhesión espermática al epitelio oviductal de una manera especie-específica. Estos espermatozoides son liberados de una manera gradual y en un número reducido momentos antes de la ovulación. En especies politocas, la proporción de

espermatozoides:ovocito al inicio de la fecundación puede estar próxima a 1:1 según algunos trabajos (Hunter, 1993). Sin embargo, se sabe muy poco sobre las moléculas específicas involucradas en esta liberación espermática, aunque deberían ser moléculas descritas en el fluido oviductal y que aumenten su concentración durante el estro. Únicamente en la especie bovina se han observado *in vitro* evidencias directas de que moléculas presentes en el fluido oviductal tipo glicoconjugados sulfatados como la heparina, el fucoidano y el dextrán sulfato, así como agentes reductores de puentes disulfuro como la penicilamina, son potentes inductores de la liberación de espermatozoides unidos a cultivos de células oviductales (Gualtieri *et al.*, 2010; Talevi y Gualtieri, 2001). En la especie porcina aún no se han descrito moléculas específicas, pero distintos trabajos han sugerido un papel del hialuronano (Brüssow *et al.*, 2008), diferentes glicosidasas oviductales (Carrasco *et al.*, 2008b), la progesterona (Hunter, 2008) e incluso cambios en el proteoma inducido por los propios gametos (Georgiou *et al.*, 2005).

#### 4.2.1.2. Cambios del ovocito en el oviducto

En algunas especies, como la bovina y la porcina, está descrito que la ZP se modifica durante el contacto del ovocito con las secreciones oviductales (Broermann *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1996). El contenido proteico del EPV también se ve modificado durante el paso del ovocito por el oviducto. Entre otros procesos, está descrito que la glicoproteína específica del oviducto OVGP1, también conocida como oviductina, se incorpora al EPV (Buhi, 2002). La implicación de las proteínas oviductales en la fecundación se ha confirmado tras la localización de éstas en la ZP, EPV y oolema de ovocitos porcinos obtenidos del oviducto (Brown y Cheng, 1986; Buhi *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2003). Para explicar la mayor incidencia de monospermia durante la fecundación de ovocitos oviductales que foliculares, se ha propuesto que estas glicoproteínas regulan la exocitosis sincronizada de los gránulos corticales y/o incrementan la sensibilidad de la ZP al contenido de los mismos (Hunter, 1991; Kim *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el papel de la OVGP1 sobre el control de la polispermia no está relacionado con la exocitosis de los gránulos corticales, ya que la unión de esta glicoproteína a la ZP se produce una vez el ovocito contacta con el fluido oviductal, incluso en ausencia de espermatozoides (Coy *et al.*, 2008a).

Las modificaciones que se han observado en la ZP de ovocitos oviductales incluyen un aumento de la resistencia a la digestión proteolítica y a la penetración espermática. Este efecto se ha denominado endurecimiento de la ZP pre-fecundación y se ha



comprobado que participa en la regulación de la polispermia (Coy y Avilés, 2010; Coy *et al.*, 2008b). Se han identificado la OVGP1 y los glicosaminoglicanos sulfatados tipo heparina como las moléculas presentes en el fluido oviductal que se adhieren a la ZP y provocan el endurecimiento pre-fecundación. Este endurecimiento conduce a una disminución del número de espermatozoides unidos a la ZP y, por tanto, a un aumento de la monospermia. La participación de estas modificaciones en el proceso de selección espermática es objeto de estudio en la actualidad.

#### **4.2.2. Mecanismos posteriores a la unión espermatozoide-ovocito**

En el momento de la fecundación, la polispermia es prevenida por modificaciones a nivel de dos estructuras ovocitarias: el oolema y la ZP (revisado por Wang *et al.*, 2003).

##### **4.2.2.1. Bloqueo a nivel de membrana plasmática**

En cuanto al bloqueo de la polispermia a nivel del oolema, éste es muy controvertido (Horvath *et al.*, 1993a; Tatone *et al.*, 1994; Wolf y Hamada, 1977) y se sabe muy poco sobre el mecanismo que actúa a este nivel en ovocitos de mamíferos, aunque lo que sí parece claro es su participación en conjunto con la ZP (Gardner y Evans, 2006). Concretamente, el bloqueo a este nivel se ha asociado con la pérdida de receptores localizados en el oolema, con capacidad fusogénica y que participan en la unión del espermatozoide (Blobel *et al.*, 1992; Zuccotti *et al.*, 1991). Algunos autores han propuesto que las diferencias entre la membrana de ovocitos fecundados y no fecundados radican en los cambios en los lípidos y en su fluidez (Wolf *et al.*, 1981). Más recientemente se ha propuesto que los cambios producidos durante el bloqueo de membrana están regulados por mecanismos dependientes e independientes de  $Ca^{2+}$  ya que ovocitos de hámster libres de ZP, tratados con drogas que inhiben o atenúan los flujos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , presentan ausencia o disminución en el bloqueo de membrana comparados con ovocitos sin tratar (Gardner *et al.*, 2007).

El bloqueo de membrana difiere significativamente entre ovocitos de mamíferos y de no mamíferos. En animales no mamíferos, como los erizos de mar y ranas (dos de los modelos más estudiados), el bloqueo de membrana implica una despolarización rápida y transitoria del oolema para que la entrada de espermatozoides al ooplasma no se vea favorecida, aunque tampoco del todo inhibida (Jaffe y Cross, 1986). La despolarización

post-fertilización de la membrana plasmática ocurre apenas unos segundos después de la fecundación, conociéndose por ello como “bloqueo rápido”, aunque dura varios minutos y se puede observar en ovocitos de erizo de mar, estrella de mar, gusano marino *Urechis*, algunos ascidios, moluscos, anélidos y anfibios anuros (Jaffe y Cross, 1986). Por el contrario, no se ha observado una despolarización significativa del oolema en ovocitos de ratona, hámster o coneja (Igusa *et al.*, 1983; Jaffe *et al.*, 1982; McCulloh *et al.*, 1983; Miyazaki y Igusa, 1981). Así pues, en mamíferos, el mecanismo del bloqueo de la polispermia a nivel del oolema no parece deberse a un cambio en el potencial de membrana. Hay que señalar que, en mamíferos, el bloqueo de la membrana plasmática se establece aproximadamente en el mismo periodo de tiempo que el bloqueo de la ZP (30-60 minutos), mientras que en no mamíferos el bloqueo del oolema se produce en cuestión de segundos tras la fecundación y el de la ZP tarda desde 30-60 segundos (erizo de mar) a varios minutos (rana) (Jaffe y Cross, 1986). Por lo tanto, en mamíferos, el bloqueo de la polispermia (a nivel de membrana o ZP) es espacialmente distinguible, mientras que en los no mamíferos el bloqueo es espacial y temporalmente (rápido o lento) diferenciable.

Como hemos comentado, poco se sabe acerca de las bases moleculares o del mecanismo del bloqueo de membrana en ovocitos de mamíferos, aunque la evidencia de su existencia proviene de varios hallazgos que datan de varias décadas. Los estudios clásicos de los ovocitos monospermicos, recuperados del apareamiento natural, han revelado la existencia de espermatozoides adicionales en el EPV (entre la ZP y la membrana plasmática) que aparentemente son incapaces de fecundar al ovocito, a pesar de estar justo al lado de la membrana (Austin, 1961; Odor y Blandau, 1949). El número de espermatozoides que se han encontrado en el EPV varían según la especie. Así pues, en ovocitos de coneja, pika y topo, donde se observan decenas o cientos de espermatozoides en el EPV, el bloqueo de membrana es altamente eficaz, siendo menos importante el bloqueo en la ZP. Sin embargo, en ovocitos de perra, oveja y ratón de campo, no se observan espermatozoides adicionales en el EPV ya que aquí el bloqueo de ZP es muy eficaz. En cualquier caso, en la mayoría de animales (ratona, mujer, rata, cobaya, gata, hurona, cerda y vaca) parecen existir ambos tipos de bloqueo para evitar la polispermia, por lo que en estos ovocitos se encuentran aproximadamente 1-10 espermatozoides en el EPV sugiriendo un efectivo bloqueo tanto a nivel de oolema como ZP limitando así el número de espermatozoides que entran al EPV (Austin, 1961; Hunter *et al.*, 1998; Odor y Blandau, 1949; Sengoku *et al.*, 1995b). En cuanto a los ovocitos de mujer existen datos clínicos obtenidos tras inseminaciones subzonales concluyendo que carecen de bloqueo a nivel de oolema (Wolf y Hamada, 1979), aunque otros estudios

proporcionan pruebas convincentes de que experimentan un bloqueo tanto a nivel de membrana como de ZP (Sengoku *et al.*, 1995a).

Para intentar clarificar las controversias observadas en los diferentes estudios, los datos sobre trabajos de fecundación *in vivo* se complementaron con experimentos realizados *in vitro* utilizando ovocitos libres de ZP, permitiendo así una distinción clara entre las respuestas observadas a nivel de ZP y de membrana plasmática. Se hicieron estudios con ovocitos de diferentes mamíferos (ratona, hámster y mujer) demostrando que los ovocitos libres de ZP inseminados eran penetrados por unos pocos espermatozoides, mientras que cuando estos ovocitos eran reinseminados, los espermatozoides fueron incapaces de penetrar los ovocitos fecundados, sugiriendo así que el oolema del ovocito fecundado difiere del oolema del ovocito sin fecundar (Horvath *et al.*, 1993b; Maluchnik y Borsuk, 1994; Sengoku *et al.*, 1995a; Wolf, 1978b; Zuccotti *et al.*, 1991). Por otra parte, el número de espermatozoides que se fusionan con los ovocitos libres de ZP no aumenta proporcionalmente cuando los ovocitos se inseminan con concentraciones espermáticas crecientes, por lo que se ha sugerido que el bloqueo a nivel de oolema se establecería como una respuesta a la activación ovocitaria (Binor *et al.*, 1982; McAvey *et al.*, 2002; Wolf, 1978a).

#### 4.2.2.2. Bloqueo a nivel de ZP y reacción cortical

El bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP se ha estudiado extensamente tanto en mamíferos como en no mamíferos, se denomina "bloqueo lento" y está asociado a la exocitosis del contenido de los gránulos corticales hacia el EPV (Barros y Yanagimachi, 1971). Como ahora explicaremos, las distintas proteínas liberadas tras la exocitosis de los GCs ("reacción cortical") van a modificar las características fisicoquímicas de la ZP haciéndola refractaria a la unión y entrada de nuevos espermatozoides en lo que se conoce como "reacción de zona" (Braden *et al.*, 1954). La reacción cortical se produce como respuesta al contacto del primer espermatozoide con el oolema. Este proceso de exocitosis es dependiente de una señal de  $Ca^{2+}$  proveniente de depósitos intracelulares que se libera en respuesta a la entrada del espermatozoide (Jones, 2005). El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular se produce cerca del sitio donde se ha producido la fusión del espermatozoide y se extiende como una onda a través del citoplasma en unos pocos segundos. A continuación se producen picos transitorios en los niveles de  $Ca^{2+}$ , a intervalos regulares, que duran hasta el momento en el que se visualizan los pronúcleos (Nakano *et al.*, 1997). Estas oscilaciones de  $Ca^{2+}$  son necesarias y suficientes para

provocar la mayoría de eventos de la activación del ovocito, incluyendo la reacción cortical y la reanudación del ciclo celular (White *et al.*, 2010).

Los gránulos corticales (CGs) son las principales vesículas secretoras de los ovocitos de mamífero y la primera publicación que recoge su presencia data de mediados del siglo XX (Austin, 1951). Los CGs difieren de las vesículas secretoras de las células somáticas en que, una vez producida la reacción cortical, el contenido liberado no vuelve a resintetizarse por lo que el ovocito queda desprovisto de ellos (Wessel *et al.*, 2001). En ovocitos de mamíferos, estas organelas están limitadas por una membrana bien definida, con un diámetro de 0.2-0.6  $\mu\text{m}$ . En la especie porcina su diámetro aproximado es de 0.16  $\mu\text{m}$  (Wang *et al.*, 1997b). Los GCs se forman a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso en un proceso continuo hasta que se produce la ovulación, después de la cual este proceso de síntesis se detiene (Anderson, 1968). Estas organelas migran durante el crecimiento y maduración del ovocito (Ducibella *et al.*, 1994; Hoodbhoy y Talbot, 1994). En ovocitos porcinos maduros, la mayoría de los GCs se localizan dentro de los primeros 4  $\mu\text{m}$  del ooplasma cortical dispuestos en forma rectilínea o hilera, a modo de monocapa, justo por debajo del oolema, aunque también se pueden encontrar algunos de ellos distribuidos en el citoplasma (Cran, 1985). En la especie bovina la disposición es muy diferente ya que los GCs migran en grupos disponiéndose por todo el ooplasma (Hosoe y Shioya, 1997). La localización de los GCs en el ovocito maduro es fundamental ya que la proximidad al oolema asegura una rápida exocitosis de estas organelas que tiene lugar en segundos, como en el erizo de mar (Abbott y Ducibella, 2001), o minutos como en el hámster (Stewart-Savage y Bavister, 1991) y el ratón (Tahara *et al.*, 1996) aunque en este último pueda prolongarse hasta 1 hora.

Sobre el contenido de los GCs se sabe que en los mamíferos poseen distintas enzimas como ovoperoxidasa (Gulyas y Schmel, 1980), N-acetilglucosaminidasa (Miller *et al.*, 1993a), enzimas tipo tripsina y proteinasas (Moller y Wassarman, 1989), calreticulina (Muñoz-Gotera *et al.*, 2001), tPA (Rekkas *et al.*, 2002) y varias proteínas de distinto peso molecular conocidas como p75, p62, p56 (Hoodbhoy y Talbot, 2001) y p32 (Gross *et al.*, 2000). En cuanto a los cambios específicos que podrían ejercer estas moléculas sobre la ZP tras la reacción cortical, sólo para  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, ovoperoxidasa y proteinasas se ha podido atribuir una función concreta en el bloqueo de la polispermia de ovocitos de mamífero.

Así pues, se ha demostrado que tras la fecundación, la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa cortical elimina el sitio de unión espermático  $\beta$ -1, 4-galactosiltransferasa (receptor del

espermatozoide caracterizado para ZP3) de modo que los espermatozoides ya no pueden iniciar la unión a la ZP (Miller *et al.*, 1993b). Sin embargo, esta teoría ha sido recientemente refutada al demostrar que ovocitos procedentes de ratones ZP3 mutantes carentes de O-glicanos, implicados en la unión espermática, pueden ser fecundados (Gahlay *et al.*, 2010). Por su parte, la ovoperoxidasa produce un endurecimiento de la ZP protegiendo al ovocito de cambios bioquímicos y mecánicos, así como de la entrada de más de un espermatozoide (Gulyas y Schmell, 1980; Heinecke y Shapiro, 1990). La ovoperoxidasa también ha sido descrita en GCs de ovocitos de estrella de mar provocando igualmente un endurecimiento de la envoltura vitelina (Deits *et al.*, 1984; Foerder y Shapiro, 1977; Hall, 1978). Por último, quizás el papel de las proteinasas sobre el bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP haya sido el más estudiado. Hace décadas se observó que en ovocitos de ratona activados con iónoforo de  $\text{Ca}^{2+}$  se libera una proteinasa tras la reacción cortical que hidroliza la ZP2 a su forma ZP2f, impidiendo que los espermatozoides reaccionados puedan penetrar el ovocito y estableciendo la reacción de zona en esta especie (Moller y Wassarman, 1989). Hoy se sabe que esta hidrólisis es la responsable del bloqueo a la unión de espermatozoides adicionales (Gahlay *et al.*, 2010) aunque esta proteinasa aún no ha sido caracterizada.

Aunque no todas han sido identificadas, el contenido de los GCs ha sido asociado reiteradamente con proteasas diferentes al observarse que tras la FIV de ovocitos de ratona activados en presencia de inhibidores de proteasas tipo tripsina y serina se aumenta el nivel de polispermia (Tawia y Lopata, 1992). Proteasas tipo serina, como el tPA se han localizado en el EPV de ovocitos de ratona fecundados o activados artificialmente, sugiriendo que es liberado a partir de los GCs (Zhang *et al.*, 1992a). La localización de tPA en GCs ha sido muy controvertida. Por un lado el hecho de que las células de la granulosa secreten tPA en presencia de la hormona LH (Canipari y Strickland, 1985a) abre la posibilidad de que el tPA pueda ser asociado con el ovocito a través las células de la granulosa mediante uniones tipo gap y, por otro lado, no existen pruebas histoquímicas o citoquímicas que sitúen al tPA directamente en los GCs. Sin embargo, la localización de tPA en el ooplasma de ovocitos de ratona (Bicsak y Hsueh, 1989), cerda (Kim y Menino, 1995) y en el extracto de GCs de ovocitos de vaca (Rekkas *et al.*, 2002) mantienen la posibilidad de que los GCs contengan tPA.

Como hemos mencionado, una vez liberadas, las proteasas corticales modifican las características de la ZP favoreciendo el bloqueo de la polispermia a este nivel. Sin embargo, después de la fecundación se ha comprobado un aumento de la solubilidad de

la ZP cuando se adiciona plasmina al medio de cultivo de embriones ovinos favoreciendo la eclosión del embrión (Menino *et al.*, 1989).

Entre las proteasas de GCs, nosotros hemos elegido para nuestro estudio el sistema plasminógeno-plasmina por ser un sistema proteolítico ampliamente descrito en procesos fisiológicos tan importantes como la fibrinólisis. Además, como hemos ido mencionando a lo largo de esta revisión, a pesar de que la información respecto a este sistema en los GCs es confusa, se sabe que está implicado en importantes procesos reproductivos como la maduración *in vitro*, la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario temprano (Papanikolaou *et al.*, 2008a).

### 4.3 El sistema plasminógeno-plasmina

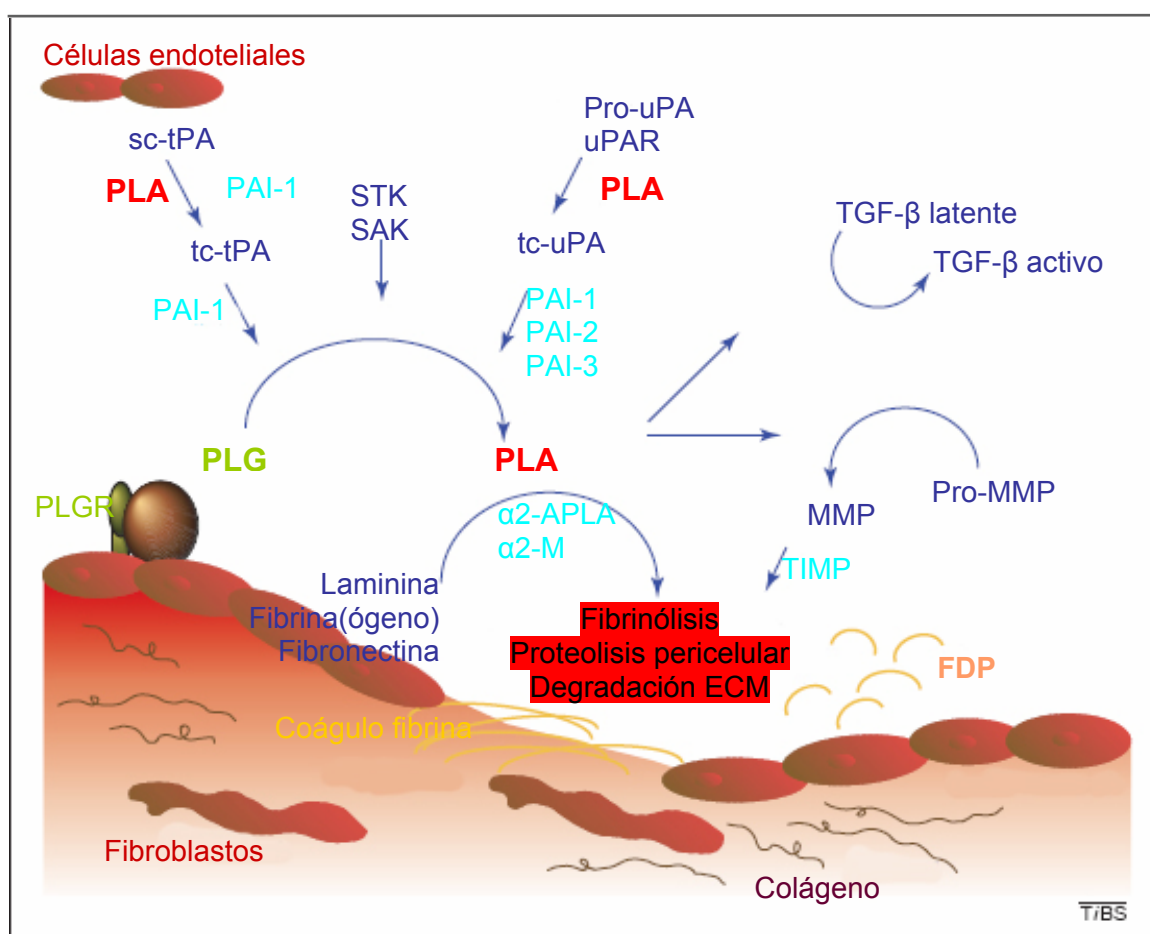
La mayoría de las enzimas proteolíticas extracelulares pertenecen a una de estas dos grandes familias: las serín proteasas, en particular el sistema de activación del plasminógeno, o las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) (Mignatti y Rifkin, 1996). El sistema plasminógeno-plasmina está involucrado en diversos procesos biológicos que requieren la regeneración tisular y/o la migración celular tales como la ovulación (Strickland y Beers, 1976) y el desarrollo embrionario (Strickland *et al.*, 1976; Valinsky *et al.*, 1981). Este sistema se caracteriza porque el zimógeno inactivo plasminógeno (PLG) es un precursor de enzima que, proteolizado mediante sus activadores específicos, da lugar a la forma activa y proteolítica, la plasmina (PLA) (Collen y Lijnen, 1991).

La diversidad y complejidad de este sistema se debe a la existencia de dos tipos de activadores que, aunque comparten la habilidad de activar el PLG, presentan características estructurales y funcionales distintas (Blasi *et al.*, 1987). Por un lado, el activador tisular del plasminógeno (tPA) actúa como el principal enzima de activación intravascular dependiente de fibrina, mientras que el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) depende de la unión a un receptor de membrana (uPAR) y no requiere fibrina (Chapman, 1997). La PLA es la enzima central de este sistema. En condiciones normales circula por el plasma en forma de proenzima, el PLG. La actividad proteolítica de la PLA formada mediante el proceso de activación del PLG está además regulada por la acción de la  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -APLA), su principal inhibidor fisiológico y, en menor medida, por la  $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$ -M). Además, la regulación inhibidora del sistema se

produce mediante los inhibidores tipo 1, 2 y 3 de los activadores del plasminógeno (PAI-1, PAI-2 y PAI-3). Adicionalmente, la fibrina es un fuerte estimulador de la actividad del tPA. Se piensa que los receptores de superficie uPAR y anexina A2 aumentan la eficiencia catalítica de la generación de PLA (Hajjar y Krishnan, 1999). Otros componentes de este intrincado sistema son los productos que aparecen tras la degradación de la fibrina (Mosher, 1990).

En la figura 4.1 se representan los distintos elementos que participan en el sistema fibrinolítico plasminógeno-plasmina y en los siguientes apartados describiremos en detalle los distintos componentes del mismo.

**Figura 4.1.** Esquema del sistema fibrinolítico plasminógeno-plasmina. Modificado de Collen y Lijnen (Collen y Lijnen, 1991).  **$\alpha$ 2-APLA:**  $\alpha$ 2-antiplasmina.  **$\alpha$ 2-M:**  $\alpha$ 2-macroglobulina. **FDP:** productos de degradación de la fibrina. **MMP:** metaloproteinasas de la matriz extracelular. **PAI-1, PAI-2 y PAI-3:** inhibidores tipo 1, 2 y 3 de los activadores del plasminógeno. **PLA:** plasmina. **PLG:** plasminógeno. **PLGR:** receptor de plasminógeno. **Pro-MMP:** pro-metaloproteinasas de la matriz extracelular. **Pro-uPA:** uPA latente. **sc-tPA:** tPA de cadena simple. **SAK:** estafiloquinasa. **STK:** estreptoquinasa. **tc-tPA:** tPA de cadena doble. **tc-uPA:** uPA de cadena doble. **TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante. **TIMP:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas. **tPA:** activador de plasminógeno tipo tisular. **uPA:** activador de plasminógeno tipo uroquinasa. **uPAR:** receptor de uPA.





### 4.3.1. Componentes del sistema plasminógeno-plasmina

#### 4.3.1.1. Plasminógeno (PLG)

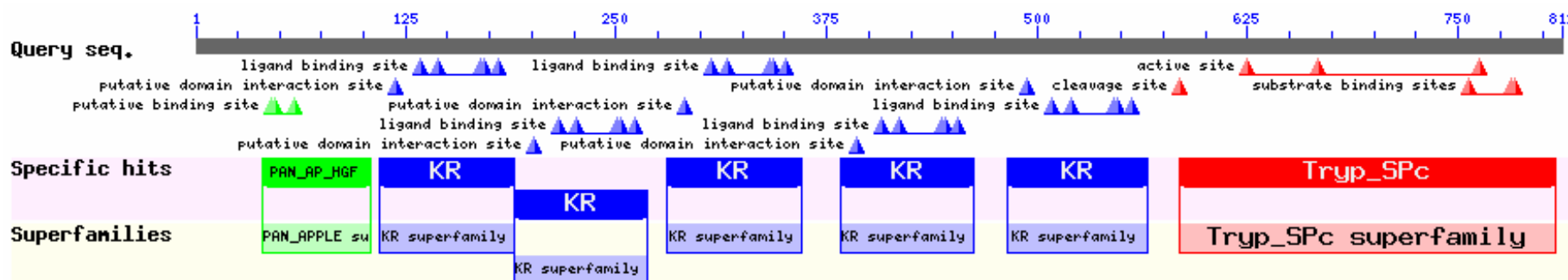
El zimógeno plasminógeno (PLG) es una proteína ubicua sintetizada principalmente en el hígado (Raum *et al.*, 1980) aunque también se ha descrito en otros lugares como los túbulos seminíferos (Saksela y Vihko, 1986).

Se caracteriza por ser una proteína con un peso molecular aproximado de 90 kDa que contiene aproximadamente un 2% de carbohidratos y tiene dos cadenas peptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas entre ellas por dos puentes disulfuro. En su cadena  $\alpha$ , la molécula de PLG presenta un dominio de unión a lisinas que media su interacción con proteínas que presentan lisinas C-terminales y que explica la baja especificidad de unión del PLG. En el extremo C-terminal de la cadena  $\beta$  contiene el dominio típico serina proteasa que es responsable de su actividad catalítica (Redlitz y Plow, 1995). Además, posee 24 puentes disulfuro y 6 dominios estructurales, cada uno con diferentes propiedades (Figura 4.2; Henkin *et al.*, 1991).

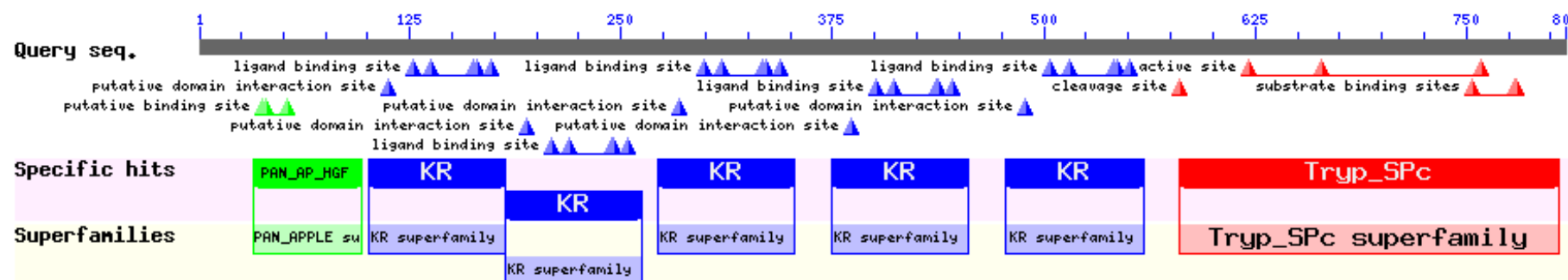
En la especie bovina, la molécula de PLG posee 812 aminoácidos (Berglund *et al.*, 1995) y en la especie porcina 809 (Chen *et al.*, 2006) estructurándose la molécula en 7 dominios (Figura 4.2), (Henkin *et al.*, 1991). El PLG tiene un dominio tipo PAN/APPLE, cinco dominios tipo Kringle y un dominio serín proteasa. El dominio PAN/APPLE consiste en una secuencia consenso de 90 aminoácidos que, gracias a la formación de puentes disulfuro, hace que durante su plegamiento la proteína tome una forma característica de manzana. Este dominio PAN/APPLE lo comparten otras serín proteasas como las proteínas plasmáticas tipo kalikreína y los factores de coagulación. Los dominios pertenecientes a la subfamilia PAN/APPLE se sitúan en el extremo N-terminal de la proteína y ejercen funciones biológicas diversas entre las que se encuentra la mediación en las interacciones proteína-proteína o proteína-carbohidrato (Tordai *et al.*, 1999). Los dominios tipo Kringle son estructurales y normalmente se encuentran en un número variable de copias (cinco en el caso de la molécula de PLG). Aparecen en las proteínas fibrinolíticas, las proteínas plasmáticas y algunas serín proteasas.

**Figura 4.2.** Dominios dentro de la molécula de PLG bovino y porcino. Tomado de (Henkin *et al.*, 1991). **PAN\_AP**: dominio PAN/APPLE. **KR**: dominios Kringle. **Tryp\_SPc**: dominio serín proteasa tipo tripsina.

**Plasminógeno bovino**



**Plasminógeno porcino**



Los dominios Kringle del PLG poseen afinidad por las lisinas libres y por los péptidos que contengan lisinas. Por último, el dominio serín proteasa tipo tripsina es el centro activo de la molécula de PLG. Normalmente este dominio es sintetizado de forma inactiva o de precursor (zimógeno) y gracias a una proteólisis limitada se libera en su forma activa.

En condiciones normales, tan solo el 20% del PLG se encuentra circulante de forma libre en el plasma y el 80% restante está unido a proteínas plasmáticas. Entre estas proteínas se encuentran el fibrinógeno y la fibrina, a las que se une el 15% del PLG total. El 50% del PLG forma un complejo disociable con la glicoproteína rica en histidina y alrededor de un 15% forma complejos disociables con la  $\alpha_2$ -APLA. De forma natural, el PLG puede presentarse en dos formas dependiendo de que en su extremo amino-terminal posea un ácido glutámico (Glu-plasminógeno) o una lisina (Lis-plasminógeno) (Saksela, 1985; Verstraete y Collen, 1986; Wallén y Wiman, 1972). Mediante una proteólisis limitada, el Glu-plasminógeno se transforma fácilmente en las formas que contienen en su extremo amino terminal lisina, valina, metionina, etc. (Collen, 1980). La activación por proteólisis limitada del Lis-plasminógeno a PLA se realiza por rotura de un enlace peptídico sencillo entre los aminoácidos Arg560-Val561 y es llevada a cabo por los activadores de plasminógeno, tPA o uPA (Collen, 1980; Takada *et al.*, 1989; Verstraete y Collen, 1986). El PLG también puede unirse a la ECM de una manera específica, saturable y reversible. Cuando se une a la ECM, este PLG se convierte en un buen sustrato para ser activado por el tPA o uPA y la PLA que se forma en consecuencia se dirige a la propia ECM protegida por un inhibidor específico y abundante como es la  $\alpha_2$ -APLA (Knudsen *et al.*, 1986). Por lo tanto, la unión del PLG a la ECM parece tener una función fisiológica en la regulación de la formación y actividad de la PLA.

Existe una conformación cerrada del Glu-plasminógeno que se extiende al enlazar residuos de lisina en una superficie de fibrina. Se cree que un cambio similar es el que tiene lugar cuando el Glu-plasminógeno se transforma en Lis-plasminógeno. El papel fisiológico de estos cambios de conformación es desconocido, aunque el efecto general es que se crea una mayor tasa de activación del PLG catalizada por el tPA (Fredenburgh y Nesheim, 1992; Wu *et al.*, 1990).

Los niveles de PLG en el plasma humano son relativamente constantes, no variando excesivamente con la edad ni el sexo, siendo la concentración normal de 2.2  $\mu\text{mol/l}$ . La vida media del PLG es de 2.2 días para el Glu-plasminógeno y de 0.8 días para el Lis-plasminógeno (Malinowski *et al.*, 1984).

#### 4.3.1.2. Plasmina (PLA)

Como ya hemos comentado, la PLA es la enzima principal del sistema PLG-PLA. Es una serín proteasa de 85 kDa que desempeña un papel central en la disolución de los coágulos sanguíneos (fibrinólisis), en la remodelación de los tejidos y en la proteólisis pericelular estando implicada directa o indirectamente a través de la activación de factores de crecimiento y otras proteinasas. La molécula de PLA está compuesta por dos cadenas: una cadena  $\alpha$ , o cadena pesada, originada por el fragmento correspondiente al extremo amino terminal (N-) del PLG; y una cadena  $\beta$ , o cadena ligera, que contiene la parte carboxi-terminal (C-) y el centro activo de la molécula (Wallén y Wiman, 1972).

En condiciones normales circula en el plasma bajo la forma de su proenzima, el PLG. La PLA se une a la  $\alpha_2$ -APLA por los lugares de unión a lisina y por el centro activo. Por ello, cuando la PLA está unida a la fibrina o asociada a la superficie celular, no se inactiva convirtiéndose en un eficaz fibrinolítico que degrada muy eficientemente la fibrina por lo que su papel en la fibrinólisis está claramente establecido (Collen y Lijnen, 1995). A través también de estos lugares de unión a la lisina, el PLG y la PLA son capaces de interactuar con los receptores del plasminógeno (PLGR) que existen en la superficie de las células endoteliales y de otras células (Plow *et al.*, 1991), tal y como se observa en la figura 4.1. Como también se observa en la figura, la PLA no es una proteasa específica, sino que presenta un amplio espectro de sustrato y se sabe que es capaz de degradar gran variedad de moléculas que forman parte de la ECM y de la membrana basal, tales como fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicanos y colágeno (Irigoyen *et al.*, 1999). Además es capaz de activar las formas latentes del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y del factor de crecimiento transformante (TFG- $\beta$ ), así como de las MMP (Falcone *et al.*, 1993; Taipale *et al.*, 1992). A nivel extracelular, la PLA también puede actuar sobre la cadena sencilla de Pro-uPA y sobre uPA (Stephens *et al.*, 1989), tal y como se observa en la figura 4.1.

Junto al uPA, la PLA posee capacidad de activar y liberar factores de crecimiento unidos a la matriz extracelular o a la superficie celular. Se ha descrito que la unión del uPA a su receptor (uPAR), no sólo activa al PLG, sino que también desencadena una cascada de señales celulares que regulan los procesos de migración celular en condiciones fisiológicas y patológicas, como es el caso de la implantación embrionaria (Aflalo *et al.*, 2004; Aflalo *et al.*, 2005).

#### 4.3.1.3. Activadores del plasminógeno (PAs)

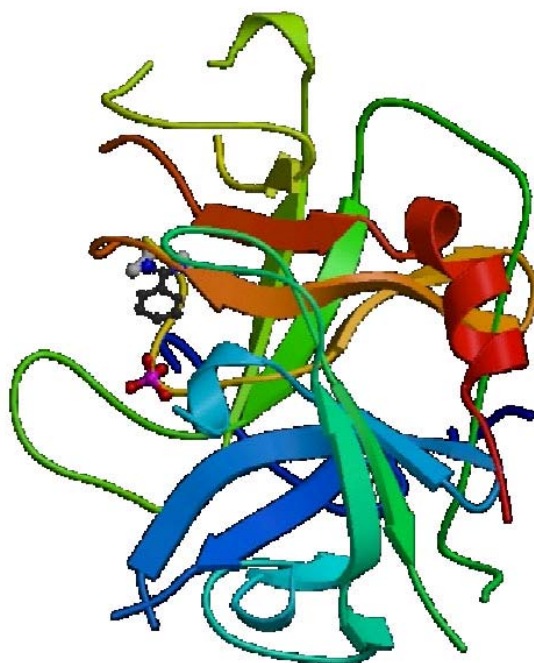
Los activadores del plasminógeno (PAs) se producen y secretan en las células en forma de proenzimas transformándose en la enzima activa por una rotura proteolítica específica (Mayer, 1990). Los PAs pueden ser endógenos (tipo tisular y tipo uroquinasa) estando presentes en la sangre y otros fluidos corporales, o exógenos como la estreptoquinasa (Reddy y Markus, 1972) y la estafiloquinasa (Sakai *et al.*, 1989) como se observa en la figura 4.1.

El activador de plasminógeno tipo tisular (tPA) y el tipo uroquinasa (uPA) catalizan la reacción específica, es decir la conversión de PLG en PLA, por la rotura de un enlace peptídico único. Ambas enzimas forman también complejos inactivos con inhibidores específicos. Estos complejos pueden disociarse para regenerar la actividad enzimática. No obstante, el tPA difiere del uPA en el peso molecular, la especificidad inmunológica y propiedades cinéticas; además, las enzimas son codificadas por genes diferentes. Los detalles del proceso de activación del PLG se examinan en las secciones siguientes.

##### 4.3.1.3.1. Activador tisular del plasminógeno (tPA)

El tPA (Figura 4.3) es una serín proteasa de 70 kDa que contiene 530 aminoácidos, entre 7-13% de carbohidratos y abunda en el plasma humano (Collen, 1987). La concentración fisiológica de tPA en plasma humano es de 5-7 ng/ml donde tiene una vida media de 2.5-5 minutos y el 95% está unido a su inhibidor específico (PAI-1) mientras que el otro 5% se encuentra en forma libre (Rijken *et al.*, 1983). Se sintetiza principalmente por las células endoteliales (Danø *et al.*, 1985) y se secreta como un polipéptido de cadena sencilla (sc-tPA) que puede procesarse *in vivo* a la forma de doble cadena (tc-tPA) mediante proteólisis de un puente polipeptídico sencillo (Irigoyen *et al.*, 1999). El tPA se expresa de forma fisiológica en lugares donde existe un estrecho contacto con los coágulos de fibrina (ej.: células endoteliales vasculares) (Kooistra *et al.*, 1994) pero su expresión aumenta en situaciones causadas o propensas a la trombosis, tales como la isquemia (Schneiderman *et al.*, 1991), heridas (Grøndahl-Hansen *et al.*, 1988) y la ovulación (Deutinger *et al.*, 1988).

**Figura 4.3.** Modelo estructural de la conformación de la molécula de tPA. La espiral roja representa la cadena  $\alpha$  mientras que las flechas verdes, azules y marrones indican regiones de la cadena  $\beta$  (Agnelli, 1993).



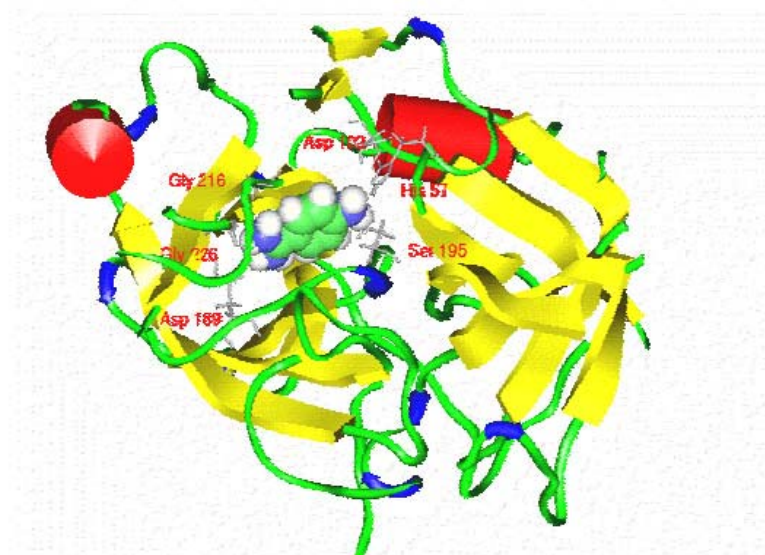
El tPA tiene una elevada afinidad por la fibrina y se activa por la unión a ésta, por lo que la función biológica principal de tPA está asociada con la fibrinólisis (Lijnen y Collen, 1982). El tPA puede unirse al extremo N-terminal de la fibronectina y al C-terminal de la laminina (Moser *et al.*, 1993; Salonen *et al.*, 1985). Estas proteínas también unen PLG, por lo que actúan como superficie de reacción para su activación eficiente en la ECM. A pesar de que la fibronectina no aumenta la activación del PLG catalizada por tPA, los fragmentos derivados de la proteólisis de la fibronectina constituyen potentes activadores de tPA (Stack y Pizzo, 1993). La unión de tPA a fibrina da como resultado un aumento de la afinidad de tPA por el PLG, favoreciendo la activación de éste sobre la superficie de los coágulos sanguíneos y evitando la activación del PLG libre circulante (Aguilar *et al.*, 2004).

#### 4.3.1.3.2. Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)

El uPA es una proteína secretada por las células endoteliales y epiteliales principalmente en los conductos excretores del organismo (como los túbulos renales). Esta serín proteasa tiene un peso molecular de 53 kDa (Günzler *et al.*, 1982) y fue

descrita inicialmente en cultivos de células de carcinoma ovárico (Astedt y Holmberg, 1976). Al igual que el tPA, el uPA (Figura 4.4) está formado por dos cadenas peptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro y presentan dos partes completamente independientes: la cadena catalítica carboxi-terminal y la cadena no catalítica amino-terminal, donde se sitúa el dominio responsable de la interacción específica con el receptor de uPA (uPAR) (Appella *et al.*, 1987) que se expresa en diferentes tipos celulares (Behrendt *et al.*, 1990).

**Figura 4.4.** Modelo estructural de la conformación de la molécula de uPA. Los cilindros rojos representan dominios de  $\alpha$ -hélice y las flechas amarillas indican regiones de la cadena  $\beta$  (Agnelli, 1993).



Cuando es secretado, el Pro-uPA es una molécula de una sola cadena polipeptídica (sc-uPA) (Günzler *et al.*, 1982). Tras la proteólisis, por parte de la PLA o la calicreína, del puente peptídico K<sup>158</sup>-I<sup>159</sup> (Danø *et al.*, 1985), la molécula se convierte en la forma de doble cadena (tc-uPA) denominada también uPA de alto peso molecular (HMW-uPA). La scu-PA actúa directamente sobre el PLG generando PLA y esta PLA convierte el sc-uPA en tc-uPA quien dirige finalmente la rápida activación del PLG. Por otro lado, el tc-uPA no tiene especificidad por la fibrina activando el PLG libre o unido a fibrina indiscriminadamente, mientras que el sc-uPA tiene una marcada especificidad por la fibrina. La concentración de sc-uPA en plasma humano no está bien establecida, variando

entre 2-20 ng/ml mientras que su vida media es muy corta, del orden de 5-8 minutos (Lijnen *et al.*, 1986).

Se sabe que el uPA modula el proceso proteolítico pericelular de la ECM y la vía del uPA juega, en general, un papel importante en la fisiología uterina, más concretamente en el inicio de la menstruación (Tabibzadeh, 1996). La expresión de uPA está regulada por mecanismos paracrinós y factores esteroideos (Casslén *et al.*, 1992; Schatz y Lockwood, 1993). Así pues, en cultivos de células endometriales estromales se ha observado que la progesterona inactiva el uPA debido a un aumento de la expresión de PAI-1 en la superficie celular (Casslén *et al.*, 1995). Como hemos comentado, el uPA se une con gran afinidad a su receptor. Esta unión activa al uPA limitando la actividad proteolítica en la superficie celular. Los componentes de la ECM son degradados por la PLA, facilitando la migración celular y la angiogénesis. La vitronectina interacciona con el uPAR activando la cascada de señal intracelular (Seiffert *et al.*, 1991).

La generación controlada de PLA unida a la superficie de las células puede modular su capacidad de migración e invasión de tejidos al regular las interacciones entre las células, la membrana basal y la ECM (Roldan *et al.*, 1990). La cascada proteolítica dependiente de uPA regula la adhesión y migración celular y está envuelta en los mecanismos de proliferación celular y regeneración tisular (Casslén *et al.*, 1995; Danø *et al.*, 1985). Además el uPA es capaz de degradar la ECM en ausencia de PLG (revisado por Laiho y Keski-Oja, 1989) sí como la fibronectina y su propio inhibidor, el PAI-1 (Keski-Oja y Vaheri, 1982; Nielsen *et al.*, 1986).

#### 4.3.1.4. Control de la expresión de tPA y uPA

La expresión de tPA y uPA está regulada a nivel transcripcional por varios factores. El promotor de tPA contiene múltiples secuencias reguladoras que le confieren la capacidad de ser estimulado por ésteres de forbol (Fisher y Grant, 1985), hormonas esteroideas naturales, dexametasona, ácido retinoico y vitamina A (Bulens *et al.*, 1995; Bulens *et al.*, 1997) y AMPc (Rickles *et al.*, 1988). Por su parte, la heparina inhibe la transcripción de tPA de manera selectiva (Au *et al.*, 1994). El estudio del promotor de tPA se ha centrado preferentemente en los sistemas endoteliales, donde es sabido que existe un promotor localizado al inicio de transcripción que se activa por glucocorticoides, progesterona, andrógenos y mineralocorticoides (Bulens *et al.*, 1995; Bulens *et al.*, 1997). En cuanto al uPA, su expresión se ve favorecida por las prostaglandinas, el AMPc, factores de



crecimiento, promotores tumorales, oncogenes, retinoides y por la luz UV (Danø *et al.*, 1985).

#### 4.3.1.5. Estreptoquinasa (STK) y estafiloquinasa (SAK)

Como hemos comentado, la STK y la SAK son activadores exógenos del plasminógeno procedentes de microorganismos patógenos, tipo estreptococo o estafilooco respectivamente, y en la especie humana están bien estudiados. Aunque no son enzimas por sí solas, forman un complejo bimolecular 1:1 con la PLA o el PLG que en última instancia cataliza la conversión de PLG libre en PLA (Reddy y Markus, 1972; Sakai *et al.*, 1989). Aunque ambos activadores poseen similitudes en cuanto a su función como cofactores, difieren en su mecanismo de acción para activar al PLG. Mientras que la STK forma un complejo activo tanto con el PLG como con la PLA, la SAK es estrictamente dependiente de la PLA (Reddy y Markus, 1972; Sakai *et al.*, 1989).

#### 4.3.1.6. Receptores de tPA (tPAR)

Los receptores del tPA se pueden dividir en dos grupos principales: 1) los receptores implicados en la eliminación fisiológica del tPA o de los complejos formados con sus inhibidores y 2) los receptores de tPA situados en la superficie celular. Los primeros son intracelulares, están asociados a la maquinaria endocítica de la célula y, en última instancia, degradan el tPA en los lisosomas permitiendo el “aclaramiento” (*clearance*) de tPA. Por ello, estos receptores sirven de reguladores negativos de la fibrinólisis vascular. Por otro lado, los receptores que localizan tPA en la superficie celular promueven la activación del PLG (Redlitz y Plow, 1995).

Además de los receptores de “aclaramiento”, numerosas células presentan tPAR en su superficie celular implicados en otras funciones. La mayoría de estos receptores unen también PLG, favoreciendo la formación de PLA más eficientemente y de forma focalizada sobre la superficie celular. De esta forma contribuyen a la regulación de la fibrinólisis así como a la degradación de otras proteínas tanto de la membrana como de la ECM. Además, no se descarta que la interacción de tPA con receptores de superficie celular pueda activar directamente señales intracelulares. En las células endoteliales, se ha identificado la anexina A2 como el principal tPAR (Cesarman *et al.*, 1994; Hajjar *et al.*,

1994), siendo unos de los receptores mejor caracterizados por su revelante papel durante la fibrinólisis vascular.

#### 4.3.1.7. Receptores de uPA (uPAR)

Los efectos biológicos del uPA, sean o no dependientes de la proteólisis, aumentan cuando se une a su receptor de membrana, uPAR (Andreasen *et al.*, 1997; Sabapathy *et al.*, 1997; Shapiro *et al.*, 1996). Este receptor es una glicoproteína anclada en la membrana por un enlace glicosil fosfatidil inositol con un dominio de unión a uPA y dos dominios de unión a vitronectina. El uPAR también se puede unir a integrinas en sitios diferentes de los que emplea para unirse a vitronectina (Irigoyen *et al.*, 1999).

A nivel celular, el uPA se une específicamente a su receptor expresado en diferentes tipos celulares (Behrendt *et al.*, 1990). Este receptor de superficie parece jugar un papel central en la regulación de la proteólisis extracelular (Mizukami *et al.*, 1995; Pyke *et al.*, 1993). La unión del uPA a uPAR está implicada en diferentes procesos biológicos como la migración celular y la regeneración tisular. Los complejos uPA:uPAR son susceptibles de ser inhibidos por los inhibidores de los activadores de PLG, lo que podría jugar un papel importante en el control de la activación del PLG a nivel tisular y la proteólisis de la ECM.

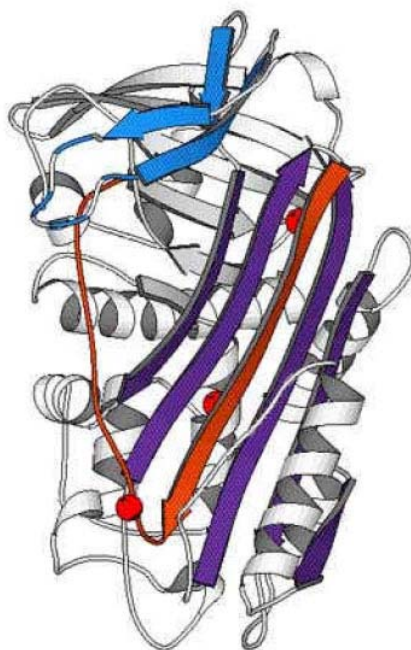
#### 4.3.1.8. Inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs)

La actividad prematura, incontrolada o en sitios inapropiados de los PAs puede provocar efectos dañinos. Del mismo modo, la actividad PLA recién generada tiene que ser estrictamente regulada para prevenir así una proteólisis no controlada. Por tanto, es necesario que los inhibidores potentes y específicos de los PAs y de la PLA estén presentes en las células, en el plasma y en otros compartimentos extracelulares. La principal función de estos inhibidores es regular las actividades catalíticas entre las enzimas y los activadores del PLG.

Se han descrito tres PAIs con actividad inhibitoria sobre la activación del PLG, todos pertenecientes a la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serín proteasas). El inhibidor de activadores de PLG tipo 1 (PAI-1 o endotelial) (Loskutoff *et al.*, 1983; van Meijer y Pannekoek, 1995), el tipo 2 (PAI-2 o placentario) (Bachmann, 1995), y el tipo 3 (PAI-3), idéntico al inhibidor de la proteína C (España *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1983).

En la especie humana, el PAI-1, también conocido como serpina1, es una glicoproteína de 50 kDa que inhibe rápidamente las formas de doble cadena de ambos PAs (tc-tPA y tc-uPA) (Andreasen *et al.*, 1997; Loskutoff *et al.*, 1989). El PAI-1 (Figura 4.5) se encuentra en el plasma a una concentración baja, 1.000 veces inferior a la  $\alpha_2$ -APLA, pero 3 ó 4 veces superior a la concentración de tPA. Así pues, la concentración normal y el rango de actividad de PAI-1 en plasma es de 5-40  $\mu$ g/l y 0-40 UI/ml, respectivamente.

**Figura 4.5.** Modelo estructural de la conformación de la molécula de PAI-1 en estado latente. Las espirales grises indican dominios de  $\alpha$ -hélice y las flechas azules, moradas y rojas indican regiones de la cadena  $\beta$  (Tucker *et al.*, 1995).



Estudios de homología demuestran que PAI-1 forma parte de la superfamilia de los inhibidores de las serín-proteasas o serpinas (Dawson y Henney, 1992; Kruithof, 1988; Loskutoff *et al.*, 1987) y es una proteína relativamente termoestable cuando se encuentra depositada sobre la matriz subendotelial (Mimuro *et al.*, 1987). La principal causa de este incremento de estabilidad es la presencia en la matriz subendotelial de una glicoproteína, la vitronectina, que es capaz de unir PAI-1 estabilizándolo (Tucker *et al.*, 1995).

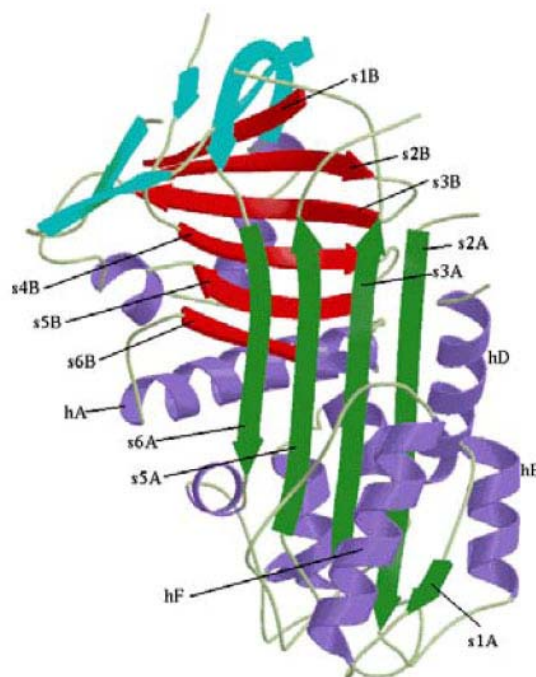
La sangre contiene dos grandes reservorios de PAI-1. Por un lado las plaquetas, que constituyen la principal reserva de PAI-1, contienen de 4.000-8.000 moléculas por célula (100-200 ng/ml de sangre) (Kruithof *et al.*, 1986) y, por otro lado, el plasma, que tiene un menor contenido de PAI-1 (alrededor de 10 ng/ml), (Lund *et al.*, 1988; Wohlwend *et al.*, 1987). Las células endoteliales del hígado, los vasos y las plaquetas parecen ser las principales fuentes de este inhibidor en el cuerpo (revisado por Kruithof, 1988).

La actividad de la PLA, regulada por el nivel de inhibidores, determinará la proteólisis de las proteínas de la ECM, la activación de procólagenasas y la degradación de diversos componentes de la membrana basal. La progesterona produce una disminución de la actividad fibrinolítica del endometrio mediante el estímulo de la degradación de uPA y el aumento de PAI-1 y uPAR (Casslén *et al.*, 1995).

El PAI-2 (Figura 4.6), también conocido como serpina B2, fue descubierto en placenta humana a finales de los años 60 al purificar una fracción proteica que poseía la capacidad de inhibir a uPA. Posteriormente, se detectó su presencia en monocitos y macrófagos (Golder y Stephens, 1983) y comenzó a conocerse su secuencia aminoacídica (Kruithof *et al.*, 1986). La homología de secuencia con muchas otras serpinas reveló que este inhibidor del activador del plasminógeno pertenecía a esta superfamilia. El PAI-2 se secreta como una glicoproteína de 60-70 kDa, aunque también existe una forma intracelular no glicosilada de 47 kDa (Genton *et al.*, 1987) que tiene una mayor afinidad por uPA que por tPA. El PAI-2 es capaz de inhibir al tPA y al uPA de la misma manera que hace el PAI-1. Sin embargo, no se han detectado complejos tPA:PAI-2 en plasma, ni siquiera durante la gestación, cuando la concentración plasmática de PAI-2 supera a la de PAI-1 (Estellés *et al.*, 1989; Kruithof *et al.*, 1995). Por ello, la función fisiológica del PAI-2 sigue siendo tema de controversia.

Por último, el PAI-3 también conocido como serpina 5, es un inhibidor no específico que actúa sobre muchas serín-proteasas como la proteína C activada, el uPA y la proteasa del espermatozoide acrosina, por lo que este PAI se ha visto relacionado con la fertilidad (Uhrin *et al.*, 2000). Se ha comprobado que PAI-3 es inmunológica y funcionalmente idéntico a uno de los inhibidores de la proteína C activada (Suzuki *et al.*, 1983), por lo que se le denomina también inhibidor de la proteína C, y puede formar complejos dependientes de heparina (España *et al.*, 1989; España y Griffin, 1989; Heeb *et al.*, 1987). Inicialmente, este inhibidor se identificó en plasma y orina humanos, donde su capacidad de inhibición de uPA es 1.000 veces menor que la de PAI-1, por lo que su importancia fisiológica es mucho menor (Stump *et al.*, 1986).

**Figura 4.6.** Modelo estructural de la conformación de la molécula de PAI-2 en estado latente. Las espirales violetas indican dominios de  $\alpha$ -hélice y las flechas rojas, verdes y azules indican regiones de la cadena  $\beta$  (Bachmann, 1995).



Estudios *in vivo*, han encontrado complejos PAI-3:uPA y PAI-3:tPA en orina y semen (España *et al.*, 1993; España *et al.*, 1991; España *et al.*, 1999) y durante la terapia trombolítica con uPA (Geiger *et al.*, 1989) y tPA (España *et al.*, 1993). A pesar de que la concentración plasmática de PAI-3 es considerablemente mayor que la de otros PAIs, su actividad inhibitoria sobre el sistema fibrinolítico en plasma es inferior.

#### 4.3.1.9. Inhibidores de la plasmina

La  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$ -APLA) es el principal inhibidor fisiológico de la PLA garantizando una vida corta de la misma tanto en la sangre como en los tejidos (Collen, 1980). En la especie humana, la  $\alpha_2$ -APLA es una glicoproteína de cadena simple con un peso molecular aproximado de 70 kDa y aproximadamente con un 13% de carbohidratos. La forma nativa de la proteína presenta dos lugares de interacción con el PLG, el centro activo del inhibidor y el extremo C-terminal que se une a los dominios Kringle del PLG (Sasaki *et al.*, 1986). El mecanismo de inhibición de la  $\alpha_2$ -APLA consiste en la formación de un complejo estequiométrico 1:1 con el centro activo de la PLA. La reacción, que es

muy rápida, depende de la disponibilidad de lugares de unión a lisina en el PLG. Una vez que el PLG se une a la fibrina, la reacción con la  $\alpha_2$ -APLA es 100 veces inferior (Wiman y Collen, 1978).

Otros inhibidores de la PLA, como la  $\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$ -M) actúan como una segunda línea de defensa. La  $\alpha_2$ -M es el único inhibidor que no pertenece a la familia de las serpinas y forma complejos covalentes con la PLA y otras serín-proteasas (Van Leuven *et al.*, 1978). La  $\alpha_2$ -M es un inhibidor más lento de la PLA que la  $\alpha_2$ -APLA y parece tener como misión neutralizar el exceso de PLA, una vez la capacidad inhibidora de la  $\alpha_2$ -APLA ha sido sobrepasada. Así pues, cuando el PLG plasmático (en concentración entre 1.5-2  $\mu$ M) es activado, la PLA formada sería neutralizada inicialmente por la  $\alpha_2$ -APLA (concentración aproximada de 1  $\mu$ M), hasta su saturación. A partir de este momento, el exceso sería neutralizado por la  $\alpha_2$ -M. Otro inhibidor de la PLA es la  $\alpha_1$ -antitripsina ( $\alpha_1$ -AT) que también inhibe a un amplio espectro de proteasas (Rijken *et al.*, 1983).

#### **4.3.2. Localización y función de los componentes del sistema plasminógeno-plasmina en el tracto reproductor de los mamíferos domésticos**

Como ya hemos comentado, el PLG está presente en muchos fluidos extracelulares incluyendo el plasma seminal (Liu *et al.*, 1996; Zaneveld *et al.*, 1973), el fluido uterino (Bruse *et al.*, 1998; Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983), el fluido folicular ovárico (Beers, 1975; Colgin y Murdoch, 1997; Reinhaller *et al.*, 1990) y el fluido peritoneal (Padilla *et al.*, 1986), habiéndose descrito también la existencia de PLG en la ZP y oolema de ovocitos de hámster (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002).

Por otra parte se ha detectado actividad PLA en procesos fisiológicos como la ovulación (Liu, 2004), la expansión de las células del *cumulus* (Liu, 2004; Liu *et al.*, 1986), la maduración del ovocito (Dow *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1986), la fecundación (Huarte *et al.*, 1993; Sa *et al.*, 2006; Smokovitis *et al.*, 1992), la reacción de zona (Cannon y Menino, 1998; Rekkas *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1992a) y la eclosión embrionaria (Kaaekuahiwi y Menino, 1990; Menino y Williams, 1987).

A continuación se exponen los principales datos que se tienen hasta la fecha sobre la localización y funciones de los distintos componentes del sistema PLG-PLA en el aparato reproductor de distintos mamíferos.

#### 4.3.2.1. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la maduración del ovocito y la expansión del *cumulus*

Se ha demostrado que los ovocitos de rata y ratona unen PLG y secretan tPA (Huarte *et al.*, 1993). Concretamente, en los ovocitos de ratona se produce tPA espontáneamente durante la maduración meiótica *in vitro* (Huarte *et al.*, 1985) y su concentración ovocitaria *in vivo* parece estar influida por el ambiente endocrino dentro del folículo (Bicsak y Hsueh, 1989; Hsueh *et al.*, 1988).

*In vitro*, la producción de tPA y uPA se ha descrito durante el cultivo de COCs de rata (Karakji y Tsang, 1995a; Karakji y Tsang, 1995b; Karakji y Tsang, 1995c) y cerdas (Kim y Menino, 1995). En ratas, la FSH y la GnRH estimulan la síntesis de tPA, pero no de uPA, en los COCs (Liu *et al.*, 1986; Ny *et al.*, 1987). Cuando el ovocito se encuentra en el interior del folículo, no presenta actividad tPA ya que las células de la granulosa que lo rodean expresan inhibina. Conforme avanza el desarrollo folicular, la inhibina va disminuyendo y comienza a sintetizarse tPA, que participa en la maduración ovocitaria y la expansión de las células del *cumulus* (Liu, 2004). La FSH, la GnRH y el péptido intestinal vasoactivo estimulan la actividad tPA. Dicha actividad es detectada en los COCs, pero no en ovocitos decumulados, indicando así que la actividad tPA en ovocitos es regulada hormonalmente vía células del *cumulus* (Liu, 2004).

En ovocitos de rata y ratona existe una relación entre la expresión de la inhibina en las células de la granulosa y la traducción del ARNm del tPA que puede desempeñar un papel regulador esencial en el desarrollo folicular, ya que se ha demostrado que la producción de la inhibina en las células de la granulosa tiene una correlación negativa con la expresión de la actividad del tPA en los ovocitos (Yan *et al.*, 1999).

Por otra parte, en ratas, se ha estudiado la capacidad de secreción de PAI-1 en cultivos de células de la granulosa, pared folicular, células del *cumulus*, células luteales y ovocitos aislados, detectándose que la mayoría de la actividad PAI-1 en el ovario se produce en pared folicular y que esta actividad aumenta después de la ovulación (Liu, 1988; Liu *et al.*, 1987b; Liu *et al.*, 1991).

Los primeros en identificar los PAs en ovocitos fueron Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1985) quienes descubrieron que los ovocitos de rata y ratona sólo producen tPA durante la reanudación de la meiosis. Luego siguieron publicándose nuevos estudios en los que se observó que los ovocitos producen tPA y uPA tanto *in vivo* como *in vitro* como

resultado de la maduración meiótica (Bicsak *et al.*, 1989a; Huarte *et al.*, 1987b; Liu *et al.*, 1987a; Liu *et al.*, 1986; Rekkas *et al.*, 2002; Strickland *et al.*, 1988). En ovocitos de rata, la síntesis de tPA aumenta durante la maduración *in vivo* (Bicsak *et al.*, 1989a), detectándose tanto en el ooplasma (Strickland *et al.*, 1988) como en el exudado de ovocitos de rata activados con ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhang *et al.*, 1992b).

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad tPA es detectada en el COC pero no en ovocitos decumulados. D'Alessandris *et al.* (D'Alessandris *et al.*, 2001) llevaron a cabo un estudio en ratas sobre la integridad de los COCs antes y después de la ovulación, estudiando la síntesis de PAs durante la expansión del *cumulus* y su relación con la disgregación de la ECM. Para ello, cultivaron *in vitro* COCs y analizaron la secreción de los PAs a diferentes tiempos de cultivo. Los resultados mostraron que la secreción de tPA y uPA por las células del *cumulus* y los ovocitos no varía durante la expansión del *cumulus*, pero aumenta dramáticamente después de la misma. Además, analizaron la actividad PA en el medio en el que habían estado los COCs observándose que el patrón de síntesis de PAs coincide con la desintegración de la matriz del *cumulus*. Los mismos patrones temporales de síntesis de PAs se observaron en COCs *in vivo*. El hecho de que la degradación de la ECM ocurre en paralelo al aumento en la síntesis y secreción de PAs apoya la hipótesis de que estas enzimas podrían desestabilizar la matriz de ácido hialurónico depositada durante la expansión del *cumulus*.

#### 4.3.2.2. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la ovulación

La ovulación implica una serie de procesos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos que afectan al ovario. Para que este proceso tenga lugar, se requiere una degradación de la matriz ovárica y una remodelación de los tejidos de la pared folicular que permita la liberación de los COCs del ambiente folicular. La existencia de actividad PA a nivel ovárico se describió hace décadas (Albrechtsen, 1957) e igualmente se ha demostrado que el fluido folicular tiene actividad PA (Smokovitis *et al.*, 1988). Así pues, estos activadores de PLG aparecen durante el proceso de remodelación tisular del ovario participando en la conversión del PLG en PLA, quien será la responsable de la disrupción de la pared folicular (Beers *et al.*, 1975). Puesto que los PAs se sintetizaban sólo en los folículos cercanos al momento de la ovulación (Beers *et al.*, 1975; Reich *et al.*, 1985; Strickland y Beers, 1976), y su actividad aumentaba en el momento preovulatorio, distintos autores asociaron a los PAs, y por ende al sistema PLG-PLA, con el desarrollo de la ovulación (Beers, 1975; Beers *et al.*, 1975; D'Alessandris *et al.*, 2001; Smokovitis *et al.*, 1988).



La síntesis de tPA y uPA está regulada por células específicas reguladas a su vez por hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Saksela y Rifkin, 1988; Vassalli *et al.*, 1991). Los dos tipos de PAs se han descrito en las células de la granulosa de folículos preovulatorios de mamíferos (Macchione *et al.*, 2000), aunque su secreción varía según la especie. Como ya hemos comentado, en ovarios de rata existen tanto el tPA como el uPA (Canipari y Strickland, 1985a; Canipari y Strickland, 1986; Galway *et al.*, 1990), en el ovario de cerda predomina el tPA (Politis *et al.*, 1990a) y, por otro lado, el uPA predomina en la células de la granulosa de ovarios de ratona y gallina (Canipari *et al.*, 1987; Hägglund *et al.*, 1996; Lafrance *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que las interacciones entre el tPA, producido por las células de la granulosa, y el PAI-1 pueden ser importantes en la ovulación (Liu, 1988) de tal modo que la expresión coordinada de tPA y PA-1 en el ovario, específicamente en el momento periovulatorio, es de vital importancia para la regulación del ciclo ovárico (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1991). Esta síntesis está mediada por gonadotropinas, de tal modo que el máximo nivel de actividad tPA en las células de la granulosa se alcanza justo antes de la ovulación, por lo que esta actividad proteolítica localizada en la superficie del ovario favorece la ruptura de la pared folicular. Por su parte, la actividad PAI-1 alcanza su máximo nivel justo después de la ovulación asegurando así la inhibición de la actividad proteolítica en el ovario, que sería perjudicial si continuara en el tiempo (Liu *et al.*, 1987b; Liu *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1993).

Muchos autores han encontrado una relación evidente entre la ovulación folicular y la producción de PAs por las células de la granulosa en el interior del folículo (Beers y Strickland, 1978; Beers *et al.*, 1975; Canipari y Strickland, 1985a; Reich *et al.*, 1985; Strickland y Beers, 1976; Wang y Leung, 1983). Como ya hemos comentado, *in vitro* las células de la granulosa sintetizan PAs y éstos también están presentes en el fluido folicular (Cajander *et al.*, 1989; Epifano *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1989; O'Connell *et al.*, 1987; Politis *et al.*, 1990b; Reich *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1993). Además, en la yegua y la vaca, se ha podido confirmar que el líquido folicular de los folículos preovulatorios alcanzan los mayores niveles de PAs y de PLG iniciando una cascada proteolítica que da lugar a la formación de PLA, quien activando a su vez a la colagenasa a nivel local de la pared folicular facilita la ruptura del folículo (Yamada y Gentry, 1995; Yamada *et al.*, 1996).

La regulación de la activación del PLG para producir PLA en el ovario y facilitar la ruptura del folículo es un complejo sistema que involucra tanto a los PAs como a los inhibidores del tPA (Beers, 1975; Beers *et al.*, 1975; LaPolt *et al.*, 1989; Reich *et al.*, 1985; Strickland y Beers, 1976). Tras la activación por el tPA, la PLA disminuye la resistencia a la tracción de la pared del folículo preovulatorio, lo que sugiere un efecto directo sobre la ovulación (Beers, 1975). En ratas hipofisectomizadas, el tPA expresado en las células de la granulosa aumenta su actividad en los folículos preovulatorios, pero no en los más pequeños, justo antes de la ovulación inducida por la LH, hCG, FSH y GnRH (Galway *et al.*, 1990; Hsueh *et al.*, 1988; LaPolt *et al.*, 1989) lo que indica que en la selección del folículo(s) dominante(s) intervienen factores que regulan la secreción de tPA.

En definitiva, la bibliografía consultada demuestra la hipótesis de que los PAs producidos por las células de la granulosa, en respuesta a la estimulación por las gonadotropinas, activan el PLG que se encuentra en el fluido para formar PLA. Esta PLA generada podría digerir los componentes de la ECM dando lugar a una cascada proteolítica que finalizaría degradando la pared del folículo (Strickland y Beers, 1976; Werb *et al.*, 1977). Sin embargo, la proteólisis extracelular mediada por los PAs no se asocia únicamente con la ovulación, sino también con procesos como la luteolisis (Feng *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). En la rata, el incremento en la expresión de tPA y PAI-1 en los últimos estadios del cuerpo lúteo (cuando las células de la granulosa y de la teca están completamente luteinizadas), está relacionado con una disminución de la producción de progesterona por el mismo, por lo que se ha sugerido un importante papel del tPA y el PAI-1 en la regresión de esta estructura ovárica, mientras que el uPA jugaría un papel más importante en el crecimiento folicular (Liu 2004).

#### 4.3.2.3. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la motilidad y capacitación espermática

La secreción de PAs ha sido documentada en distintas especies durante la espermatogénesis (Lacroix *et al.*, 1977; Vihko *et al.*, 1984), la liberación de espermatozoides en los túbulos seminíferos (Fritz y Karmally, 1983; Lacroix *et al.*, 1981), en extractos de espermatozoides (Rekkas *et al.*, 1991; Rekkas *et al.*, 2000), en el plasma seminal (Smokovitis *et al.*, 1987; Zaneveld *et al.*, 1973), en el acrosoma (Smokovitis *et al.*, 1992; Taitzoglou *et al.*, 2004; Taitzoglou *et al.*, 1996) y en espermatozoides eyaculados.

En la especie humana, los PAs favorecen la motilidad espermática y la reacción acrosómica (Hong *et al.*, 1985; Taitzoglou *et al.*, 2003; Taitzoglou *et al.*, 2004). En la especie bovina, la PLA favorece la motilidad espermática y la reacción acrosómica de los espermatozoides ya capacitados (Hong *et al.*, 1985; Taitzoglou *et al.*, 2003; Taitzoglou *et al.*, 2004). El mecanismo por el que la PLA podría favorecer la capacitación espermática, y posterior reacción acrosómica parece estar basado en la proteólisis y la generación de sustancias fusogénicas. Por un lado, se ha sugerido que las modificaciones que tienen lugar en la superficie espermática durante la capacitación requieren de una proteólisis limitada (Talbot y Chacon, 1981; Talbot y Franklin, 1978) y que las proteasas tipo tripsina pueden ejercer esta función estimulando la capacitación y/o reacción acrosómica (Meizel, 1985). Por otro lado, la PLA favorece la activación de la fosfolipasa A2, enzima dependiente de calcio, presente en los espermatozoides (Guérette *et al.*, 1988). Esta fosfolipasa es un potente favorecedor de la reacción acrosómica en los espermatozoides de mamífero (Llanos *et al.*, 1982). De la activación de esta enzima se obtiene como producto la aparición de ciertos lisolípidos (como el LPC o ácidos grasos cis-insaturados) que son conocidos por su actividad fusogénica y su capacidad de acelerar la reacción acrosómica en presencia de calcio (Yanagimachi y Suzuki, 1985). Como vemos, la generación de PLA acaba favoreciendo la capacitación y/o reacción acrosómica por su poder de activar otras enzimas presentes en el espermatozoide.

#### 4.3.2.4. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación y en el bloqueo de la polispermia

Puesto que el proceso de fecundación tiene lugar en el oviducto, es importante en primer lugar revisar las referencias existentes relacionadas con la presencia de componentes del sistema PLG-PLA en esta región.

En el oviducto bovino, se ha demostrado mediante RT-PCR la presencia o actividad de los PAs y de la PLA, observándose un alto contenido de ARNm para uPA justo antes de la ovulación y un marcado descenso del mismo justo después de la ovulación (Finlay *et al.*, 1983; Gabler *et al.*, 2001). Por el contrario, la expresión de PAI-1 se mantuvo estable durante todo el ciclo estral. Al realizar zimogramas con el contenido obtenido de realizar el lavado de los oviductos, se observaron zonas caseinolíticas conteniendo PLG de aproximadamente 28 y 50 kDa, mientras que el ensayo de actividad uPA reveló que la mayor actividad se encuentra en la fase luteal temprana y media (Finlay *et al.*, 1983; Gabler *et al.*, 2001). Sin embargo, en este mismo estudio se observó un aumento en la

concentración de ARNm para las MMP en el momento cercano a la ovulación y de los transcritos en la fase luteal temprana-media. Además, los zimogramas de los lavados oviductales revelaron que la actividad proteasa de 70 kDa es máxima en los momentos previos a la ovulación. La observación de que varios componentes de la ECM están regulados de forma diferente en los oviductos bovinos indica que las interacciones locales entre estos componentes, factores de crecimiento, gametos y embriones son posibles y que además podrían influenciar el proceso de fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Finlay *et al.*, 1983; Gabler *et al.*, 2001).

Igualmente, se ha identificado el ARNm de PAI-1 en el tejido oviductal de la especie porcina (Kouba *et al.*, 2000b). El inhibidor PAI-1 es de los principales que sintetiza y secreta la porción ístmica del oviducto porcino pudiendo participar en la fase temprana del desarrollo embrionario (Buhi *et al.*, 1996; Kouba *et al.*, 2000a). La expresión de esta proteína sugiere interacciones fisiológicamente importantes con los gametos en el momento de la fecundación y con los embriones al comienzo de la división embrionaria. El uPA y el PAI-1 también se encuentran en oviductos de la especie bovina durante todo el ciclo estral y protegen a la ZP embrionaria de la degradación (Gabler *et al.*, 2001).

Igualmente, se ha observado actividad de los PAs tanto en el fluido oviductal como en la fracción de membrana del tejido oviductal de hembras de hámster superovuladas (Jimenez Diaz *et al.*, 2000).

Todas estas evidencias sugieren que el sistema PLG-PLA ha de tener algún rol de importancia en el proceso de fecundación planteándose algunas hipótesis relacionadas con el control de la polispermia (Axelrod, 1985; Huarte *et al.*, 1993; Menino y Williams, 1987; Queenan *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1992a) que aún no han sido totalmente confirmadas. Por ejemplo, ha sido descrito que tPA participa en el endurecimiento la ZP (Zhang *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1992a) y que se encuentra presente en los GCs de ovocitos bovinos (Rekkas *et al.*, 2002).

A mediados de los años 90 se sugirió que una de las familias de proteasas que pudieran estar implicadas en la modificación proteolítica de la ZP era el propio sistema PLG-PLA (Hajjar, 1995). Investigaciones previas ya habían sugerido que el endurecimiento de la ZP de ovocitos de rata se debía a la participación del tPA (Zhang *et al.*, 1992a), mientras que el uPA participaría en la eclosión del blastocisto (Menino *et al.*, 1989). Cannon y Menino (Cannon y Menino, 1998) indicaron que la PLA, a concentraciones fisiológicas, es capaz de alterar el perfil polipeptídico y la integridad

estructural de la ZP en la especie bovina. En ratonas, los ovocitos ovulados contienen y secretan tPA y el esperma eyaculado contiene uPA (Huarte *et al.*, 1987a). Por lo tanto, ambos gametos poseen los componentes necesarios para activar al PLG y producir PLA. Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993) describieron en ratón que la adición de PLG al medio de fecundación aumenta el número de espermatozoides unidos a la ZP y el porcentaje de ovocitos fecundados. Por el contrario, la adición de anticuerpos anti-activadores disminuye la unión de los espermatozoides a la ZP y por tanto la fecundación (Benau y Storey, 1987; Benau y Storey, 1988; Saling, 1981).

En su estudio, Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1992a) indicaron la presencia de tPA en el exudado recogido de ovocitos de rata tras ser activados, ya fuera mediante tratamiento con ionóforo de calcio o penetración espermática. Igualmente, estos autores activaron ovocitos con ionóforo en presencia y ausencia de un anticuerpo anti-tPA. Observaron que en presencia de anti-tPA, la resistencia de la ZP a la digestión proteolítica disminuía por lo que indicaron que la ZP podría ser modificada por los componentes del sistema PLG-PLA, y más concretamente que el tPA podría ser liberado de los GCs y actuar sobre la ZP produciendo un endurecimiento de la misma. Así pues, la modificación proteolítica de la ZP por los PAs, la PLA y/o sus inhibidores podría participar en eventos relacionados con la fecundación, tales como la unión de los espermatozoides a la ZP, el endurecimiento de la zona o la penetración espermática.

Por su parte, Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1985) demostraron en ratas y ratonas que tanto los ovocitos secundarios como los fecundados presentan actividad tPA. En los ovocitos secundarios la actividad se localizó a nivel intracelular, mientras que en los fecundados fue a nivel extracelular. Los resultados de estos experimentos mostraron que en el ovocito fecundado la mayoría de la actividad tPA no está asociada con la ZP. Este mismo grupo reportó más tarde en el ratón que la adición de PLG al medio de fecundación incrementa el número de espermatozoides unidos a la ZP y el de ovocitos fecundados, indicando que también aumentó la actividad PLA (Huarte *et al.*, 1993).

Sin embargo, existe cierta controversia sobre el papel del sistema PLG-PLA en la regulación de la penetración espermática, ya que distintos trabajos han demostrado tanto un efecto favorecedor de la penetración (Huarte *et al.*, 1993) como inhibidor de la misma o favorecedor de la monospermia (Zhang *et al.*, 1992a), incluso ausencia de efecto sobre este parámetro (Kim *et al.*, 2009; Papanikolaou *et al.*, 2008b).

#### 4.3.2.5. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la implantación del embrión

El descubrimiento del papel del sistema PLG-PLA en la implantación se basa en las evidencias que han demostrado la presencia de sus diversos componentes en el útero en las primeras etapas de la gestación. Por ejemplo, en la especie porcina, se ha detectado presencia de PAs en el fluido uterino recogido *in vivo* de cerdas gestantes y estos activadores aumentan su concentración de manera tiempo-dependiente en el medio de cultivo *in vitro* donde se han mantenido los embriones porcinos (Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983). *In vivo*, la aparición de PAs a nivel uterino es bifásica. Existe una primera fase de síntesis (días 10-12 de gestación), coincidiendo con el estadio de elongación embrionaria, y una segunda fase de liberación (días 14-16) coincidiendo con el momento en el que el contenido de ADN de los blastocistos aumenta de forma marcada.

Igualmente, se ha detectado el sustrato de los PAs, es decir el PLG, en el fluido uterino de cerdas gestantes (Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983). Este PLG uterino, que probablemente procede de un trasudado de suero, alcanza su concentración máxima en el día 12 de gestación. Así pues, se ha sugerido que el blastocisto tiene la capacidad de generar PLA dentro del lumen uterino. Sin embargo, en este mismo periodo, el endometrio uterino secreta inhibidores de PLA. En cerdas gestantes, la actividad inhibitoria sobre la PLA aumenta unas 7 veces entre los días 10.5 y 12 de gestación y sobre el día 12 cada cuerno uterino contiene alrededor de 3-4 mg de inhibidores de PLA. Este aumento en la liberación de inhibidores de PLA también se puede provocar en cerdas prepúberes tras una administración exógena de estradiol, por lo que se ha sugerido que el comienzo en la síntesis de estrógenos por parte del blastocisto elongado desencadenaría la liberación de inhibidores de PLA por parte del endometrio materno. Estos inhibidores servirían para prevenir la cascada de reacciones proteolíticas iniciadas por los PAs secretados por los blastocistos que, de otra manera, podrían dañar el epitelio uterino (Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983)

En la especie humana, se ha comprobado que la producción de hCG por parte del embrión inhibe parcialmente la producción de urokinasa y proteasas por el trofoblasto, regulando de esta manera su proliferación celular y desarrollo, a fin de no invadir de manera incontrolada el organismo materno (Zhang *et al.*, 2002). Igualmente se ha observado en ratas que el trofoblasto produce uPA y posee receptores para el mismo, originando un efecto proteolítico justo en el frente de la zona de avance del trofoblasto (Aflalo *et al.*, 2004; Aflalo *et al.*, 2005).

Se ha descrito actividad PA en embriones de rata (Liedholm y Astedt, 1975), ratona (Sherman *et al.*, 1976; Strickland *et al.*, 1976), coneja (Grobner y Menino, 1994), cerda

(Fazleabas *et al.*, 1983; Mullins *et al.*, 1980), oveja (Menino *et al.*, 1989) y vaca (Menino y Williams, 1987). Igualmente se ha demostrado que, durante la eclosión, el embrión preimplantatorio produce uPA (Berg y Menino, 1992; Harvey *et al.*, 1995; Menino y Williams, 1987; Zhang *et al.*, 1994) y tPA (Carroll *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1992a) acelerando el crecimiento embrionario. Estos PAs están involucrados en la reparación de los tejidos y la migración celular durante la embriogénesis (Bode y Dziadek, 1979; Fazleabas *et al.*, 1983), en el desarrollo embrionario temprano (Axelrod, 1985; Marotti *et al.*, 1982; Strickland *et al.*, 1976) y la fase de eclosión del blastocisto (Bartlett y Menino, 1993; Dyk y Menino, 1991; Menino *et al.*, 1989; Whiteside *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1992a).

El mecanismo por el que los PAs favorecerían la implantación supone que los blastocistos liberan los PAs al medio y puesto que el fluido uterino contiene PLG, la conversión del mismo a PLA permitiría que esta enzima proteolítica remodelara el endometrio uterino favoreciendo/permitiendo la implantación. Como ya hemos comentado, se ha demostrado que esta liberación embrionaria de PAs es bifásica (Sherman *et al.*, 1976; Strickland *et al.*, 1976) y alcanza sus máximos durante los días en los que los blastocistos han de implantarse (Fazleabas *et al.*, 1983). Curiosamente, también durante estos días cercanos a la implantación, las propias células endometriales aumentan la síntesis de inhibidores de la PLA que, a su vez, son incorporados por el trofoblasto embrionario (Fazleabas *et al.*, 1982). Así pues, como podemos observar, una vez más el control de este complejo sistema proteolítico estaría garantizado, evitándose así una proteólisis descontrolada o excesiva que provocara daños en el endometrio o el propio embrión.

A lo largo de esta revisión hemos podido comprobar que el sistema PLG-PLA es un sistema imbricado, complejo, ubicuo, con importantes funciones fisiológicas en el organismo y una compleja regulación en la que participan activadores, inhibidores e inhibidores de los activadores. Se trata de un sistema en el que distintos actores participan “activando” y “desactivando” toda una cascada de reacciones de las que aún se desconocen algunas de sus funciones. Sin embargo, como hemos descrito, existen numerosas referencias e indicios de que este peculiar sistema, tan ampliamente estudiado y conocido en procesos como la fibrinólisis, podría jugar un importante papel en el proceso de la fecundación. Con el objetivo de arrojar algo de luz sobre el sistema PLG-PLA y su papel en la fecundación nos hemos planteado los objetivos y experimentos de la presente Tesis Doctoral.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Recogida y transporte de ovarios

Los ovarios bovinos utilizados en este estudio se obtuvieron de hembras bovinas de aptitud cárnica (Asturiana, Charolés, Limousine) y mixta (Simmental), de edades comprendidas entre los 12-18 meses sacrificadas en el matadero de Orihuela (Alicante, España).

Los ovarios de hembras porcinas prepúberes híbridas comerciales (Large White x Landrace) de 90-100 kg de peso se obtuvieron en el matadero de la empresa “El Pozo” situado en Alhama de Murcia (Murcia, España).

Ambos tipos de ovarios se recogieron inmediatamente después del sacrificio de los animales y se transportaron en un termo con **solución salina fisiológica** (SSF) (0.9% w/v de NaCl, Sigma S-9888) suplementada con 100 mg/l de sulfato de kanamicina (Sigma K-1377) a 38.5°C. La llegada de los ovarios hasta el laboratorio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Murcia se realizó dentro de un plazo máximo de 3 horas desde el sacrificio de los animales.

Una vez en el laboratorio, los medios utilizados para el lavado de los ovarios fueron los siguientes:

**Solución de cetrimida (Cetab**, bromuro de hexadecil-trimetilamonio, Sigma H-5882) al 0.04% (w/v): se empleó para el lavado de los ovarios antes de introducirlos en SSF.

**Solución salina fisiológica:** la misma utilizada para el transporte de ovarios desde el matadero.

Ambas soluciones fueron preparadas con agua bidestilada y se mantuvieron a temperatura ambiente. Para el transporte y lavado de ovarios las soluciones fueron atemperadas a 38.5°C.



## 5.2. Obtención y maduración de ovocitos

Los medios utilizados para la obtención de ovocitos de fueron los siguientes:

**Medio de recogida de ovocitos bovinos (OCM):** consistió en medio TCM-199 con L-Glutamina y sales de Hanks (Sigma M-0393) suplementado con 1% de alcohol polivinílico (PVA, Sigma, P-8136), 4.2 mM de bicarbonato sódico (Sigma S-5761) y 10 mM de Hepes (Sigma H-4034) (Edwards y Hansen, 1996). En el día de su uso, el medio se suplementó con 2 mM de glutamina (Sigma G-8540), 50 UI/ml de penicilina (Sigma P-3032) y 50 µg/ml de estreptomicina (Sigma S-9137).

**Medio de recogida de ovocitos porcinos (PBSD):** este medio se preparó con tampón fosfato salino de Dulbecco (Sigma D-8662) suplementado con 1 mg/ml de PVA (Sigma P-8136) y 0.005 mg/l de rojo fenol (Sigma P-3532) como indicador de pH.

### 5.2.1. Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos

Los complejos células del *cumulus oophorus*-ovocito (COCs) de los ovarios bovinos se aspiraron de folículos no atrésicos (2 a 6 mm de diámetro). Para ello, se utilizó una aguja de 18G unida a una jeringa de 10 ml. El contenido folicular se depositó en placas de Petri. Bajo el estereomicroscopio (Nikon® SMZ-10A) se seleccionaron aquellos ovocitos considerados aptos para ser madurados, que fueron los que presentaban su citoplasma homogéneo y tres o más capas de células del *cumulus*.

Una vez seleccionados, los COCs se lavaron en **Medio de maduración de ovocitos bovinos (OMM)**. Este medio consistió en una solución stock de TCM-199 con sales de Earle y L-Glutamina (Sigma, M-5017) a la que se añadió 26.20 mM de bicarbonato sódico (Sigma, S-5761) (Edwards y Hansen, 1996). Tras su preparación, el OMM stock se filtró (0.22 µm) y se conservó a 4°C hasta el día de su uso. Antes de su utilización para la MIV de ovocitos, el medio OMM stock se suplementó con suero fetal bovino (SFB) (AntibodyBcn S.L., Barcelona, España), L-Glutamina, gentamicina, piruvato sódico, gonadotropina sérica equina (PMSG; Foligon, Intervet B.V. internacional, Boxmeer, Holanda) y gonadotropina coriónica humana (hCG; Veterin corion, Divasa Farmavic, Barcelona, España) según se describe en la tabla 5.1. Tanto este medio como todos los utilizados en este estudio para el cultivo de gametos se equilibraron para ajustar el pH

hasta 7.4 en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad durante un mínimo de 3 horas antes de su uso.

**Tabla 5.1.** Suplementación del medio OMM para MIV bovina (Edwards y Hansen, 1996).

| Componente                            | Concentración |
|---------------------------------------|---------------|
| <b>SFB</b>                            | 10% (v/v)     |
| <b>Gentamicina</b> (Sigma G-1272)     | 50.0 µg/ml    |
| <b>PMSG</b>                           | 10 UI/ml      |
| <b>hCG</b>                            | 10 UI/ml      |
| <b>Piruvato sódico</b> (Sigma P-2256) | 0.2 mM        |
| <b>L-Glutamina</b> (Sigma G-8540)     | 2 mM          |

Finalmente, los COCs bovinos seleccionados se introdujeron en el medio OMM en atmósfera saturada de humedad a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 22-24 h a razón de 1 COC por cada 10 µl de medio, en grupos de 50 COCs (Coy *et al.*, 2005).

### 5.2.2. Maduración *in vitro* de ovocitos porcinos

Los ovocitos se obtuvieron mediante la aspiración, con aguja de 18G unida a una jeringa de 10 ml, de folículos ováricos con un diámetro entre 3-6 mm. El contenido folicular se recogió en tubos estériles y se dejó sedimentar aproximadamente durante 5 min. Pasado este tiempo, se tomó el sedimento diluyéndose con PBS y depositándolo en placas de Petri. Bajo el estereomicroscopio, se seleccionaron aquellos COCs rodeados por tres o más capas de células del *cumulus*, con un aspecto compacto y un citoplasma homogéneo y granulado.

Los COCs seleccionados se lavaron una vez en PBS atemperado y dos veces en medio NCSU-37 previamente equilibrado. Dicho medio se preparó en el laboratorio añadiendo por orden los diferentes componentes que se especifican en la tabla 5.2. Este medio se conservó en condiciones estériles a 4°C durante un máximo de dos semanas.

**Tabla 5.2.** Composición del medio NCSU-37 stock (Petters y Wells, 1993).

| Componente   | Concentración (mM) |
|--|--------------------|
| <b>NaCl</b> (Sigma S-9888)                             | 108.73             |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> (Sigma S-5761)                | 25.07              |
| <b>KCl</b> (Sigma S-5405)                              | 4.78               |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (Sigma P-5655)     | 1.19               |
| <b>MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b> (Sigma M-1880) | 1.19               |
| <b>CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O</b> (Sigma C-7902) | 1.70               |
| <b>Glucosa</b> (Sigma G-7021)                          | 5.55               |
| <b>D-Sorbitol</b> (Sigma S-1876)                       | 12.00              |
| <b>Penicilina</b> (Sigma P-3032)                       | 0.18               |
| <b>Estreptomicina</b> (Sigma S-9137)                   | 39.00 UI/ml        |

Para la MIV, el medio NCSU-37 stock se suplementó con cisteína,  $\beta$ -mercaptoetanol, insulina, dibutil AMP cíclico (dbAMPc), fluido folicular porcino (PFF), PMSG y hCG a las concentraciones indicadas en la tabla 5.3 (Funahashi *et al.*, 1997). El cultivo se llevó a cabo a razón de 1 ovocito por cada 10  $\mu$ l de medio cultivándose en grupos de 50 COCs. Pasadas 20-22 h de cultivo, los COCs fueron transferidos a medio NCSU-37 libre de PMSG, hCG y dbAMPc donde se lavaron dos veces y se cultivaron durante 20-22 h más (Funahashi y Day, 1993).

El PFF se obtuvo tras la aspiración de folículos ováricos de 3-6 mm de diámetro, centrifugación (800 g, 30 min, 4°C) y filtrado por 0.22  $\mu$ m. Las alícuotas de 1 ml se conservaron a -20°C hasta su uso.

**Tabla 5.3.** Suplementos del medio NCSU-37 para MIV de ovocitos porcinos (Funahashi *et al.*, 1997).

| Componente                             | Concentración |
|--|---------------|
| <b>Cisteína</b> (Sigma C-7352)         | 0.57 mM       |
| <b>β-mercaptoetanol</b> (Sigma M-7522) | 5.00 μM       |
| <b>Insulina</b> (Sigma I-6634)         | 5.00 mg/l     |
| <b>dbAMPc</b> (Fluka 34988)            | 1.00 mM       |
| <b>PFF</b>                             | 10% (v/v)     |
| <b>PMSG</b>                            | 10 UI/ml      |
| <b>hCG</b>                             | 10 UI/ml      |

### 5.3. Obtención y procesado de espermatozoides.

#### 5.3.1. Espermatozoides bovinos.

Las muestras de espermatozoides bovinos procedieron de dosis congeladas de machos adultos de la raza autóctona “Asturiana de los Valles”, cedidas por la Asociación de Criadores de esta misma raza (ASEAVA, Gijón, España). El semen se conservó en nitrógeno líquido en pajuelas de 0.25 ml.

Para su utilización en los diferentes experimentos, las pajuelas de semen fueron descongeladas en un baño atemperado a 38°C durante 45 segundos y su contenido se depositó en tubos Falcon sobre un gradiente de Percoll® (GE Healthcare, Piscataway, EEUU) 90% y 45% previamente atemperado (Parrish *et al.*, 1989). La preparación de los gradientes de Percoll se describe en la tabla 5.4 y la composición del medio SPERM-TALP en la tabla 5.5.

Los espermatozoides depositados sobre el gradiente fueron seleccionados por centrifugación a 900 g, durante 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en medio SPERM-TALP suplementado, centrifugado (300 g, 8 minutos) y finalmente resuspendido en 350 μl de medio FIV-TALPb suplementado (tabla 5.6). Se evaluó la motilidad y se determinó la concentración espermática antes de su uso en FIV.

**Tabla 5.4.** Composición y preparación del gradiente de Percoll®.

| <b>Solución 10X stock</b>  |                           |
|--|---------------------------|
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración (mM)</b> |
| <b>NaCl</b> (Sigma S-9888)   | 799.96                    |
| <b>KCl</b> (Sigma S-5405)  | 30.85                     |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O</b> (Sigma S-9638) | 28.98                     |
| <b>Hepes</b> (Sigma H-4034)  | 99.87                     |
| <b>Percoll 90%</b>   |                           |
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración (mM)</b> |
| <b>Solución 10X stock</b>  | 20 ml                     |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> (Sigma S-5761)                            | 25.00                     |
| <b>Lactato sódico</b> (Sigma L-7900)                               | 43.57                     |
| <b>Percoll®</b>  | 180.00 ml                 |
| <b>MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O</b> (Sigma M-2393)             | 0.395                     |
| <b>CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O</b> (Sigma C-7902)            | 1.95                      |
| <b>Percoll 45%</b>   |                           |
| <b>Componente</b>  | <b>Volumen (ml)</b>       |
| <b>Percoll 90%</b>   | 5.00                      |
| <b>Medio SPERM-TALP suplementado</b>                               | 5.00                      |

**Tabla 5.5.** Composición del medio SPERM-TALP (Parrish *et al.*, 1989).

| <b>SPERM-TALP stock</b>  |                           |
|--|---------------------------|
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración (mM)</b> |
| <b>NaCl</b> (Sigma S-9888)   | 100.00                    |
| <b>KCl</b> (Sigma S-5405)  | 3.20                      |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O</b> (Sigma S-9638) | 0.30                      |
| <b>Lactato sódico</b> (Sigma L-7900)                               | 21.50                     |
| <b>CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O</b> (Sigma C-7902)             | 2.00                      |
| <b>MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O</b> (Sigma M-2393)             | 0.40                      |
| <b>Hepes</b> (Sigma H-6147)  | 10.00                     |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> (Sigma S-5761)                            | 25.00                     |
| <b>SPERM-TALP suplementado</b>                                     |                           |
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración</b>      |
| <b>BSA</b> (Sigma A-9647)  | 0.60 %                    |
| <b>Piruvato sódico</b> (Sigma P-2256)                              | 1.00 mM                   |
| <b>Gentamicina</b> (Sigma G-1272)                                  | 50.00 µg/ml               |

**Tabla 5.6.** Composición del medio FIV-TALPb (Parrish *et al.*, 1989).

| <b>FIV-TALPb stock</b>   |                           |
|--|---------------------------|
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración (mM)</b> |
| <b>NaCl</b> (Sigma S-9888)   | 114.00                    |
| <b>KCl</b> (Sigma S-5405)  | 3.20                      |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O</b> (Sigma S-9638) | 0.30                      |
| <b>Lactato sódico</b> (Sigma L-7900)                               | 10.00                     |
| <b>CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O</b> (Sigma C-7902)             | 2.00                      |
| <b>MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O</b> (Sigma M-2393)             | 0.50                      |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> (Sigma S-5761)                            | 25.00                     |
| <b>FIV-TALPb suplementado</b>                                      |                           |
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración</b>      |
| <b>BSA</b> (Sigma A-6003)  | 0.60 % (w/v)              |
| <b>Piruvato sódico</b> (Sigma P-2256)                              | 0.20 mM                   |
| <b>Heparina</b> (Sigma H-3349)                                     | 1.75 UI                   |
| <b>Gentamicina</b> (Sigma G-1272)                                  | 50 µg/ml                  |

### 5.3.2. Espermatozoides porcinos

Los espermatozoides porcinos se obtuvieron recogiendo el semen de verracos de fertilidad probada mediante el método manual (King y Macpherson, 1973). La primera fracción del eyaculado (concentración baja de espermatozoides) fue eliminada y la fracción rica en espermatozoides fue recogida en un termo estéril precalentado a 37°C y filtrada mediante gasas estériles para descartar las secreciones de las glándulas de Cowper. Inmediatamente tras la recogida de la fracción rica, el semen fue diluido 1:1 (v/v) en medio BTS (*Beltsville Thawing Solution*) precalentado a 37°C, cuya composición se describe en la tabla 5.7. Las muestras diluidas fueron transportadas hasta el laboratorio donde el semen se diluyó de nuevo en medio BTS en una proporción de 1:10 (v/v). De este modo fueron conservadas a 15°C hasta su uso.

**Tabla 5.7.** Diluyente BTS para procesado de espermatozoides de verraco (Pursel y Johnson, 1975).

| Componente  | Concentración (mM) |
|---|--------------------|
| Glucosa (Sigma G-7021)                                    | 0.0002             |
| Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O (Sigma E-4884)     | 36.36              |
| NaHCO <sub>3</sub> (Sigma S-5761)                         | 15.00              |
| Citrato-Na <sub>3</sub> •2H <sub>2</sub> O (Sigma S-4641) | 20.00              |
| KCl (Sigma P-5405)  | 5.00               |

Para su uso en los experimentos, las muestras de semen se centrifugaron a 800 g durante 10 min a 25°C. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió 1 ml de la muestra de semen en una columna de gradientes de Percoll 45/90 cuya composición fue la misma descrita para la especie bovina (tabla 5.4) Tras una centrifugación a 2500 g durante 30 min, el sedimento constituido por los espermatozoides que atravesaron los gradientes se recuperó y se lavó en TALPp suplementado (Tabla 5.8) mediante una nueva centrifugación (2500 g, 10 min). El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en medio TALPp de nuevo. Se evaluó la motilidad una vez acabado el procesado de los espermatozoides y se calculó la concentración espermática final mediante un analizador automático *SpermaCue*<sup>®</sup> (Minitüb-Ibérica, Tarragona, España). Finalmente, se ajustó la concentración a la deseada para su uso en FIV.



**Tabla 5.8.** Composición del medio TALPp (Rath *et al.*, 1999).

| <b>TALPp stock</b>   |                           |
|--|---------------------------|
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración (mM)</b> |
| <b>NaCl</b> (Sigma S-9888)   | 114.00                    |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b> (Sigma S-5761)                            | 25.07                     |
| <b>KCl</b> (Sigma S-5405)  | 3.20                      |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O</b> (Sigma S-9638) | 0.35                      |
| <b>MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O</b> (Sigma M-2393)             | 0.50                      |
| <b>Lactato Ca•5H<sub>2</sub>O</b> (Sigma C-8356)                   | 8.00                      |
| <b>Lactato sódico</b> (Sigma L-7900)                               | 10.00                     |
| <b>Glucosa</b> (Sigma G-7021)                                      | 5.00                      |
| <b>Cafeína</b> (Sigma C-0750)                                      | 2.00                      |
| <b>Kanamicina</b> (Sigma K-1377)                                   | 0.17                      |
| <b>Rojo fenol</b> (Sigma P-3532)                                   | 0.003                     |
| <b>PVA</b> (Sigma P-8136)  | 1.00 mg/ml                |
| <b>TALPp suplementado</b>  |                           |
| <b>Componente</b>  | <b>Concentración</b>      |
| <b>BSA</b> (Sigma A-9647)  | 0.30 % (w/v)              |
| <b>Piruvato sódico</b> (Sigma P-2256)                              | 0.12 mg/ml                |

#### 5.4. Fecundación *in vitro* (FIV)

##### 5.4.1. FIV en la especie bovina

La FIV fue realizada a una concentración final de  $10^6$  espermatozoides/ml. Treinta minutos antes de ser fecundados, se añadieron 25  $\mu$ l de una solución penicilamina-epinefrina-heparina (PHE, tabla 5.9) a cada pocillo conteniendo 50 COCs maduros en 500  $\mu$ l del medio FIV-TALPb suplementado. El cocultivo de gametos se realizó durante 18-20 horas en el incubador.

**Tabla 5.9.** Preparación y composición de la solución PHE (Parrish *et al.*, 1989).

| <b>SOLUCIÓN P</b>                          |          |
|--|----------|
| <b>Solución salina fisiológica</b>         | 10.00 ml |
| <b>Penicilamina</b> (Sigma P-5000)         | 2.00 mM  |
| <b>SOLUCIÓN H</b>                          |          |
| <b>Solución salina fisiológica</b>         | 10.00 ml |
| <b>Hipotaurina</b> (Sigma H-1384)          | 1.00 mM  |
| <b>SOLUCIÓN LACTATO-METABISULFITO</b>      |          |
| <b>PBSD</b> (Sigma D-5652)                 | 50.00 ml |
| <b>Lactato sódico</b> (Sigma L-7900)       | 29.43 mM |
| <b>Metabisulfito sódico</b> (Sigma S-1516) | 5.29 mM  |
| <b>SOLUCIÓN E</b>                          |          |
| <b>Solución lactato-metabisulfito</b>      | 40.00 ml |
| <b>Epinefrina</b> (Sigma E-4250)           | 0.25 mM  |
| <b>SOLUCIÓN PHE</b>                        |          |
| <b>PBSD</b> (Sigma D-5652)                 | 16.00 ml |
| <b>Solución P</b>                          | 10.00 ml |
| <b>Solución H</b>                          | 10.00 ml |
| <b>Solución E</b>                          | 4.00 ml  |

La solución PHE se filtró (0.22  $\mu$ m) y se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso en FIV bovina.

#### 5.4.2. FIV en la especie porcina

Los COCs madurados *in vitro* se decumularon parcialmente y se dispusieron en grupos de 50 en 500  $\mu$ l de medio de fecundación TALPp suplementado. Posteriormente, se les añadieron los espermatozoides a una concentración de  $10^5$  espermatozoides/ml. El cocultivo se mantuvo durante 18-20 horas en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5°C y atmósfera saturada de humedad.

### 5.4.3. Fijación, tinción y valoración microscópica de los ovocitos fecundados *in vitro*

A las 18-20 horas post FIV, los ovocitos se lavaron mediante repetido pipeteo en medio PBS-D con el objetivo de eliminar espermatozoides adheridos a la ZP y restos de células del *cumulus*. Posteriormente fueron fijados durante 30 minutos en glutaraldehído al 0.5% (v/v) en PBS-D. Tras la fijación, los ovocitos fueron lavados nuevamente en PBS-D y teñidos durante 15 minutos con una solución de 1 mg/ml de Hoescht 33342 (Sigma B-2261) en PBS-D. Transcurrido este tiempo, los ovocitos fueron transferidos a un portaobjetos en microgotas de 5 µl de medio de montaje consistente en una solución de 1 mg/ml Hoescht en PBS y glicerol (1:1 v/v). Los ovocitos fueron evaluados bajo microscopio de fluorescencia (Leica® modelo DMLS) a 410 nm de excitación y observados a 200 y 400 aumentos (Coy *et al.*, 2008b).

Se determinaron para cada ovocito las siguientes variables:

- Porcentaje de ovocitos penetrados (**Penetración**): número de ovocitos, por cada 100 ovocitos maduros en MII, que presenta al menos un espermatozoide (en forma descondensada o de pronúcleo masculino) en el interior del ooplasma.
- Porcentaje de monospermia (**Monospermia**): número de ovocitos, por cada 100 ovocitos penetrados, que presenta un único espermatozoide (en forma descondensada o de pronúcleo masculino) en el interior del ooplasma.
- Porcentaje de formación de pronúcleo masculino (**Pronúcleo masculino**): número de ovocitos, por cada 100 ovocitos penetrados, que presentan al menos un espermatozoide en forma de pronúcleo masculino.
- Número medio de espermatozoides por ovocito (**Esp/Ovocito**): número medio de espermatozoides (en forma descondensada o pronuclear) por ovocito penetrado.
- Número medio de pronúcleos masculinos por ovocito penetrado (**Pronúcleos masculinos**).
- Número medio de espermatozoides descondensados por ovocito penetrado (**Descondensados**).
- Número medio de espermatozoides adheridos a la ZP del ovocito (**Esp/ZP**): número medio de espermatozoides que permanecen adheridos a la ZP de los ovocitos penetrados después del lavado.

### 5.4.4. Fecundación *in vitro* con plasminógeno (PLG) o plasmina (PLA)

Se utilizó PLG bovino comercial (Sigma P-9156) y se prepararon alícuotas siguiendo las recomendaciones del fabricante conteniendo 0.5 U (76.92 µg/ml) en un volumen de 10 µl. Para los experimentos de FIV con PLA, se prepararon igualmente soluciones alícuotas a partir de PLA humana (Sigma P-1867) conteniendo 0.4 U (136.36 µg/ml) en un volumen de 5 µl. Las alícuotas de PLG y PLA se conservaron a -20°C hasta su uso.

Los COCs madurados *in vitro* fueron incubados en 500 µl de medio de TALPb (especie bovina) o TALPp (especie porcina) con PLG o PLA añadidos a distintos tiempos y concentraciones según se describe en el diseño experimental. En todos los experimentos fue utilizado un grupo control de COCs incubados en medio de fecundación sin PLG ni PLA. Para la FIV, los COCs porcinos fueron denudados suavemente con una pipeta hasta eliminar parcialmente las células del *cumulus* mientras que los COCs bovinos se fecundaron sin denudar. Este protocolo es el que utilizamos rutinariamente en nuestro laboratorio para conseguir los mejores resultados de FIV en ambas especies.

### 5.5. Digestión de la zona pelúcida (ZP)

Para la digestión de la ZP, los COCs madurados *in vitro* libres del *cumulus* se distribuyeron en 50 µl de una solución de pronasa de *Streptomyces griseus* (Sigma P-8811) al 0.5% en PBS (Coy *et al.*, 2002). La digestión de la ZP fue observada continuamente a 200 aumentos en un estereomicroscopio equipado con una placa calefactora a 38.5°C. El **tiempo de digestión en pronasa** se definió como el tiempo transcurrido desde la colocación de los ovocitos en la solución de pronasa hasta la desaparición completa de la ZP.

### 5.6. Detección mediante inmunocitoquímica de los componentes del sistema PLG-PLA en ovocitos bovinos y porcinos

Tras la MIV, los ovocitos se decumularon de forma mecánica en PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Sigma D-5773) (PBS-sin-Ca-Mg). En los casos en los que se pretendía observar el oolema, la ZP se eliminó utilizando pronasa al 3% en PBS-sin-Ca-Mg. Tras dos lavados en PBS-sin-Ca-Mg para eliminar los restos de pronasa, los ovocitos se fijaron en paraformaldehído (Sigma P-6148) al 2% (w/v) en PBS-sin-Ca-Mg durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los ovocitos se lavaron dos veces en PBS-

sin-Ca-Mg y durante 15 minutos en PBS-D-sin-Ca-Mg suplementado con 1% glicina (Sigma G-8001). A continuación, los ovocitos se lavaron tres veces en PBS-D-sin-Ca-Mg y se permeabilizaron durante 10 min con Tritón X-100 (Sigma T-8787) al 0.1% (v/v) en PBS-D-sin-Ca-Mg para ser posteriormente lavados dos veces más en PBS-D-sin-Ca-Mg. Una vez permeabilizados, los ovocitos se incubaron 1 hora en cámara húmeda y protegidos de la luz en microgotas que contenían el anticuerpo primario anti-PLG (BP750), anti-tPA (AP02244SU-N) o anti-uPA (AP02255SU-S), todos ellos anticuerpos policlonales de Acris-antibodies (Herford, Alemania) diluidos en PBS-D-sin-Ca-Mg suplementado con 1% BSA tal y como se refleja en la tabla 5.10.

Este fue el protocolo convencional seguido en nuestro estudio (digestión de ZP con pronasa y permeabilización con tritón), aunque se hicieron pruebas preliminares en algunos ovocitos sin permeabilizar comprobando que los resultados de inmunomarcaje eran similares. Igualmente, cuando la ZP era digerida con solución ácida de Tyrodes (Sigma T-1788) los resultados eran similares a los observados con pronasa.

Para la detección del PLG se usó una técnica indirecta en dos capas. Tras la incubación en el anticuerpo primario los ovocitos se lavaron 3 veces en PBS-D-sin-Ca-Mg y se incubaron nuevamente durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado a TRITC (isotiocianato de tetrametil rodamina) (Sigma T-6778).

Para la detección de los dos activadores del plasminógeno (tPA y uPA) se utilizó una técnica indirecta en tres capas. Tras la incubación en el anticuerpo primario, los ovocitos se lavaron 3 veces en PBS-D-sin-Ca-Mg y se incubaron durante 1 hora en el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra producido en conejo (Sigma G-5518). A continuación los ovocitos se lavaron tres veces en PBS-D-sin-Ca-Mg y se incubaron en el anticuerpo terciario anti-IgG de conejo producido en cabra y conjugado a TRITC (Sigma T-6778) en las mismas condiciones que el secundario usado para el PLG.

Se realizaron controles con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a TRITC para descartar su unión inespecífica a los ovocitos tanto madurados *in vitro* como fecundados *in vitro*.

**Tabla 5.10.** Concentración de lectinas y anticuerpos utilizados para determinar PLG y PAs mediante inmunocitoquímica en ovocitos porcinos y bovinos.

|   | Tipo de anticuerpo                       | Dilución o concentración |
|---|--|--------------------------|
| <b>Anticuerpo primario (policlonal)</b> | anti-PLG porcino producido en conejo     | 1:100                    |
|   | anti-tPA humano producido en cabra       | 1:100                    |
|   | anti-uPA humano producido en cabra       | 1:50                     |
| <b>Anticuerpo secundario</b>            | anti-IgG de cabra producido en conejo    | 1:400                    |
| <b>Anticuerpo terciario</b>             | anti-IgG de conejo-TRITC                 | 1:50                     |
| <b>Lectinas-FITC</b>                    | <i>Arachis hypogaea</i> agglutinin (PNA) | 10 µg/ml                 |
|   | <i>Lens culinaris</i> agglutinin (LCA)   | 50 µg/ml                 |

En algunos casos, para identificar con mayor precisión la localización de los PAs y el PLG en los ovocitos se realizó una doble tinción. En primer lugar, los ovocitos se incubaron con los anticuerpos específicos y, posteriormente, con lectinas conjugadas a FITC (isotiocianato de fluoresceína) que indican la localización de los GCs. De este modo, al capturar la imagen en el microscopio confocal, se podría observar la coincidencia en una misma región ovocitaria de la tinción de color rojo (TRITC), correspondiente al marcaje de los anticuerpos específicos, con la verde (FITC) correspondiente al marcaje de los GCs, dando un color anaranjado que podría indicar la localización cercana de los PAs y el PLG en la zona cortical de los ovocitos. Así pues, para el marcaje de los GCs con las lectinas específicas de cada especie, los ovocitos porcinos se incubaron 30 min protegidos de la luz con la lectina PNA (*Arachis hypogaea* agglutinin, Sigma L-7381) (Yoshida *et al.*, 1993) y los bovinos con lectina LCA (*Lens culinaris* agglutinin, Sigma L-9262) (Hosoe y Shioya, 1997) a la concentración descrita en la tabla 5.10. La técnica de tinción de GCs con estas lectinas se utiliza de forma rutinaria en nuestro laboratorio (Coy *et al.*, 2002; Coy *et al.*, 2005; Romar *et al.*, 2005).

Después del tratamiento con anticuerpos y/o lectina, los ovocitos se lavaron en PBS-D- sin-Ca-Mg y se colocaron sobre un portaobjetos con medio de montaje (Slow Fade, Antifade Kit, Invitrogen, Eugen, Oregón, EEUU). Las muestras se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su estudio en un plazo máximo de 2 semanas.

Todas las muestras de inmunocitoquímica se visualizaron en un microscopio confocal TCS NT (Leica) equipado con un láser de Krypto-Argón y Helio-Neón para la excitación de la fluoresceína (FITC) y la rodamina (TRITC) respectivamente. Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo de inmersión Leica PL APO UV 63.5X 1.32NA y se grabaron digitalmente a nivel del ecuador del ovocito.

### **5.7. Evaluación de la capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides bovinos y porcinos mediante citometría de flujo**

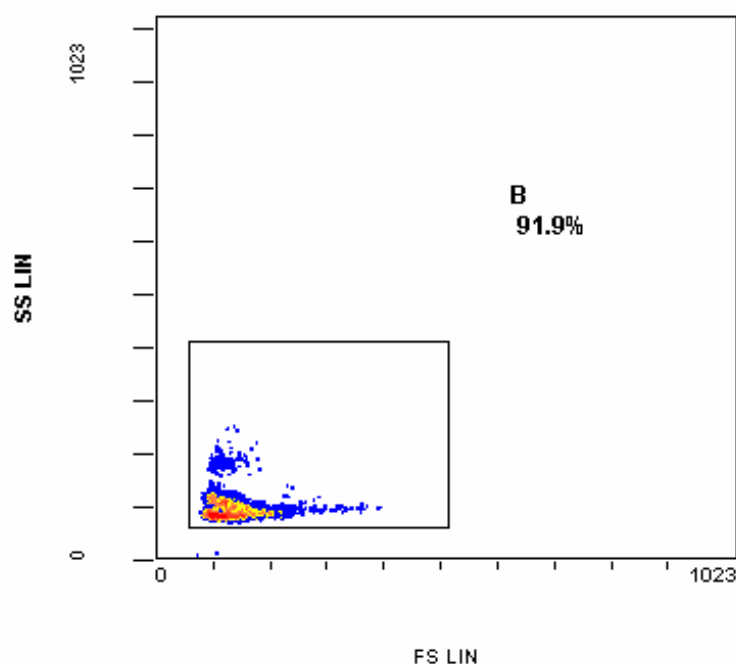
Para realizar el estudio del efecto del sistema PLG-PLA sobre las variables seleccionadas para valorar la funcionalidad de los espermatozoides bovinos y porcinos se utilizó un citómetro *Coulter Epics XL* (Beckman Coulter Inc., Miami, Florida, EEUU) equipado con un láser de plasma de Argón refrigerado por aire de 488 nm y 15 mW de potencia.

En cada proceso de análisis se evaluaron un total de 10.000 células y se registraron 4 mediciones por muestra. Los datos medidos por el citómetro fueron analizados usando el programa Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.).

Inicialmente se hizo una selección primaria basada en el tamaño y complejidad de la superficie celular para excluir partículas contaminantes, aglutinaciones, células somáticas, etc., de manera que se seleccionaron sólo las partículas con un tamaño (Forward Scatter, FS) y complejidad de la superficie (Side Scatter, SC) compatible con las células espermáticas (Figura 5.1).

La intensidad de fluorescencia que presentaban los espermatozoides fue analizada mediante el registro de fluorescencia verde (FL1), recogido a través de un filtro de 525 nm, mientras que el registro de fluorescencia roja (FL3) se realizó a través de un filtro de 575 nm.

**Figura 5.1.** Imagen obtenida del citómetro de flujo donde se observa una población de células seleccionadas como espermatozoides.



### 5.7.1. Evaluación de la capacitación espermática (CA)

Para evaluar el proceso de CA se utilizó como indicador el grado de desorden lipídico de las membranas de los espermatozoides (Harrison *et al.*, 1996). Para ello, las muestras fueron teñidas simultáneamente con Merocianina 540 (M540, Sigma 323756) y Yo-Pro 1 (YP1, Molecular Probes, Eugene, Oregón, EEUU) siguiendo el protocolo descrito por Harrison *et al.* (Harrison *et al.*, 1996).

M540 es un colorante hidrofóbico que tiñe con mayor intensidad (rojo) las membranas celulares que presenta un alto grado de desorden lipídico, como es el caso de los espermatozoides capacitados, mientras que YP1 es un colorante (verde) que permite evaluar la viabilidad celular.

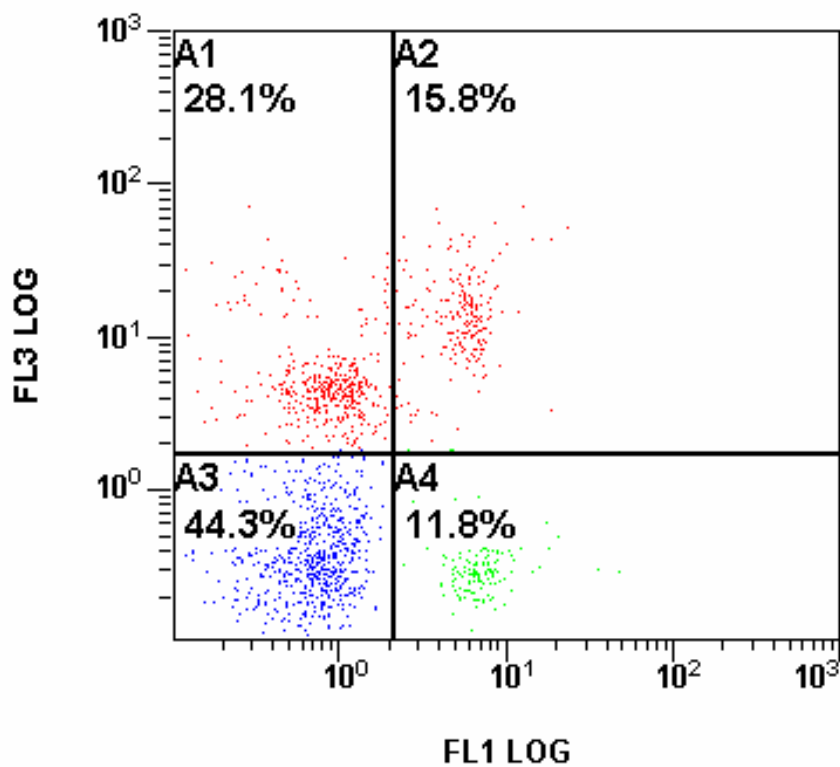
En primer lugar, se prepararon soluciones stock de M540 (1 mM) y Yo-Pro 1 (25  $\mu$ M) en DMSO (Sigma D-2650). A continuación, se añadieron 2.7  $\mu$ l de solución stock de M540 (concentración final 2.7  $\mu$ M) y 1  $\mu$ l de Yo-Pro (concentración final 25 nM) por cada ml de muestra de semen diluida (conteniendo 5-10  $\times 10^6$  células). Posteriormente las muestras se evaluaron en el citómetro de flujo como hemos descrito anteriormente. Al utilizar conjuntamente dos colorantes fue posible distinguir las cuatro subpoblaciones espermáticas que se describen a continuación: 1) Espermatozoides vivos y con alteración



de los lípidos de membrana o capacitados (únicamente fluorescencia roja, grupo A1); 2) Espermatozoides muertos con alteración de los lípidos de membrana (fluorescencia verde y roja, grupo A2); 3) Espermatozoides vivos y sin desorden lipídico en su membrana (ningún signo de fluorescencia, grupo A-3) y 4) Espermatozoides muertos y con reducido desorden lipídico (fluorescencia verde, grupo A4).

Para facilitar la interpretación de los resultados, decidimos agrupar todos los espermatozoides muertos en una única categoría (A2+A4).

**Figura 5.2.** Imagen tomada del citómetro de flujo representando la lectura de una muestra problema con las cuatro subpoblaciones espermáticas analizadas. A1: vivos capacitados; A2: muertos capacitados; A3: vivos no capacitados; A4: muertos no capacitados. Se indican los porcentajes para cada una de las subpoblaciones.



### 5.7.2. Evaluación de la reacción acrosómica (RA)

El estado del acrosoma se evaluó mediante una tinción simultánea con la lectina *Arachis hypogaea* agglutinin conjugada a FITC (PNA-FITC, Sigma L-7381) y yoduro de propidio (IP, Sigma P-4170). La lectina se une selectivamente al contenido acrosomal y al estar conjugada a FITC, que emite fluorescencia verde, detecta los acrosomas con membrana alterada. Por otra parte, el IP permite evaluar la viabilidad espermática y emite fluorescencia roja.

Las muestras de semen (1 ml,  $5-10 \times 10^6$  células) se incubaron en presencia de 2  $\mu$ l de PNA-FITC (100 mg/ml) y 5  $\mu$ l de una solución 500 mg/ml de IP a temperatura ambiente durante 10 min en la oscuridad y posteriormente se evaluaron en el citómetro de flujo como hemos descrito anteriormente. Tal y como se representa gráficamente en la figura 5.3 se valoraron tres subpoblaciones espermáticas: 1) Espermatozoides vivos con acrosoma intacto (ausencia de señal de PI y PNA-FITC); 2) Espermatozoides vivos con acrosoma dañado (señal verde de PNA-FITC) y 3) Espermatozoides muertos (marcados con IP) con o sin acrosoma intacto.

**Figura 5.3.** Representación gráfica de las subpoblaciones espermáticas tras la tinción conjunta con IP y PNA-FITC para valorar el estado del acrosoma.



### 5.8. Ensayo de unión espermatozoides-ZP

Para la obtención de ZPs, grupos de 50 ovocitos fueron lavados dos veces en PBSD tras la MIV y se hicieron pasar sucesivas veces a través de una pipeta Pasteur adelgazada por calor hasta conseguir un diámetro de poro inferior al tamaño de los ovocitos. De este modo, se rompían los ovocitos y el contenido del ooplasma se liberaba al medio pudiendo aspirar las ZPs vacías. Éstas se lavaron 3 veces en PBSD y se

transfirieron al medio de fecundación correspondiente, donde fueron incubadas distintos tiempos con los espermatozoides siguiendo los protocolos ya explicados tanto para la especie bovina como para la especie porcina.

### **5.9. Visualización en tiempo real del efecto de la plasmina sobre la unión espermatozoides-ZP en la especie porcina**

Los ovocitos porcinos, incubados con espermatozoides durante 2 horas según los protocolos de FIV descritos anteriormente, fueron denudados por sucesivos pases a través de una pipeta automática ajustada a un volumen de 200  $\mu$ l, permitiendo desprender las células del *cumulus* y el exceso de espermatozoides adheridos sin romper las ZPs. Una vez denudados, los ovocitos se colocaron individualmente sobre microgotas de 4  $\mu$ l de PBS suplementado con SFB al 10% (v/v) y cubiertas con aceite mineral en una placa de Petri (*Falcon*<sup>®</sup> Petri dish 50x9mm).

Los ovocitos se visualizaron con un objetivo de contraste Hoffman a 200 aumentos sobre un microscopio invertido Nikon (Diaphot 300, Tokio, Japón) dotado de platina calefactada a 38.5°C (Tokai-Hit, Shizuoka, Japón). Con la ayuda de un micromanipulador *TransferMan NK* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y un microinyector *CellTram Air* (Eppendorf) cada ovocito fue inmovilizado mediante una micropipeta de sujeción (*Eppendorf Sterile VacuTips* con diámetro interno 15  $\mu$ m, longitud 100  $\mu$ m y ángulo 30°) y colocado de modo que se pudieran visualizar los espermatozoides adheridos a la ZP. Una vez que el ovocito fue inmovilizado, se realizaron repetidos intentos de desprender los espermatozoides de la ZP mecánicamente mediante una micropipeta de inyección (*Eppendorf*<sup>®</sup> *Sterile VacuTips* con diámetro interno 8  $\mu$ m, longitud 400  $\mu$ m y ángulo 30°) conectada a un segundo micromanipulador *CellTram Oil* (Eppendorf). Para ello se incidió con el extremo libre de la micropipeta directamente sobre la zona de unión entre el espermatozoide y la ZP. A continuación, y una vez comprobada la firme unión entre el espermatozoide y la ZP, se aspiró con la pipeta de microinyección un volumen de 0.00002  $\mu$ l ( $2 \times 10^{-5}$   $\mu$ l) de la solución de PLA (0.4 U) de una microgota previamente preparada en la misma placa de Petri donde se estaba trabajando con los ovocitos y se volvió a situar la micropipeta sobre el mismo ovocito y en la misma posición en la que se había intentado desprender al espermatozoide adherido a la ZP.

El volumen de PLA aspirado es una estimación realizada a partir del cálculo del volumen del cilindro que es la pipeta de microinyección y que tiene un diámetro interno de

8  $\mu\text{m}$  y una longitud hasta el codo de 400  $\mu\text{m}$ . Así pues el volumen del cilindro es aproximadamente de 20096  $\mu\text{m}^3$ , dato que transformamos a  $\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^{-5}$   $\mu\text{l}$ ). La PLA aspirada se expulsó directamente sobre la ZP y tras dejarla actuar durante 30 segundos se procedió de nuevo a intentar desprender el espermatozoide adherido del mismo modo que se había realizado anteriormente. Las imágenes de video correspondientes fueron capturadas mediante una cámara analógica (Sony SCC-E458P, Sony España S.A., Madrid, España) acoplada al microscopio y conectada a un monitor (Philips 221T, Philips Ibérica, S.A., Madrid, España) y a un reproductor-grabador (LG Electronics, Madrid, España).

### 5.10. Diseño experimental

La concentración de PLG en el plasma humano es de unos 200  $\mu\text{g/ml}$  (Leipnitz *et al.*, 1988) ó 2.4  $\mu\text{M}$  (Wohl *et al.*, 1982). En el cerdo y en la vaca, no se encontraron datos precisos en la bibliografía sobre los niveles plasmáticos de PLG. Por lo tanto, partiendo del dato de la especie humana, y utilizando PLG de plasma bovino, se añadió al medio de fecundación (500  $\mu\text{l}$ ) una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  conteniendo 0.5 U (76.92  $\mu\text{g/ml}$  de PLG) de modo que la concentración final de PLG fue de 1 U (153.84  $\mu\text{g/ml}$ ). Sabiendo que además era posible que existiera PLG adicional en los COCs, la concentración final en el sistema de FIV podría estar cerca de los 200  $\mu\text{g/ml}$  del plasma humano.

Nuestra hipótesis de trabajo, como ya se ha mencionado, suponía que el sistema PLG-PLA estaba implicado en la fecundación en las especies bovina y porcina. Su función se evidenciaría como consecuencia de la conversión del PLG del medio de FIV (añadido por nosotros y/o presente en los gametos) en PLA mediante los activadores tPA o uPA. Estos PAs podrían estar presentes en el ovocito, en el espermatozoide o en ambos gametos.

Para conseguir el **Objetivo 1** (describir el papel del sistema PLG-PLA en la fecundación bovina y porcina) se diseñaron los experimentos 1, 2 y 3.

### **5.10.1. Experimento 1. Efecto del PLG añadido al medio de cultivo a distintos tiempos sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina**

Este experimento se diseñó para determinar el efecto del plasminógeno añadido a diferentes tiempos sobre los resultados de FIV. Para ello, se fecundaron *in vitro* ovocitos bovinos y porcinos en el medio de FIV convencional (grupo control) y en el medio de FIV suplementado con 1 U (153.84 µg/ml) de PLG a 3 tiempos diferentes: 30 minutos antes de la adición de los espermatozoides (30' pre-FIV), al mismo tiempo que la adición de los espermatozoides (0'-FIV) y 30 minutos después (30' post-FIV). Se realizaron 4 replicados con 50-60 ovocitos por grupo para cada una de las especies estudiadas. Se evaluaron las variables Penetración, Monospermia, Pronúcleo masculino, Esp/Ovocito, Pronúcleos masculinos, Descondensados y Esp/ZP.

### **5.10.2. Experimento 2. Efecto del PLG añadido al medio de cultivo a diferentes concentraciones sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina**

Una vez comprobado que el PLG en el medio de FIV tenía efecto sobre los resultados, se decidió investigar si el efecto era dosis-dependiente y si las dosis con efecto significativo sobre los resultados podrían ser menores a la empleada en el experimento 1. Para ello se fecundaron *in vitro* ovocitos en medio de FIV control, en medio de FIV suplementado con 0.25 U (38.46 µg/ml) ó 0.5 U (76.92 µg/ml) de PLG, en ambos casos 30 minutos después de la adición de los espermatozoides. Se realizaron 3 replicados con 50-60 ovocitos por grupo y se evaluaron las variables Penetración, Monospermia, Pronúcleo masculino, Esp/Ovocito, Pronúcleos masculinos, Descondensados y Esp/ZP.

### **5.10.3. Experimento 3. Efecto de la adición de PLA al medio de cultivo sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina**

El experimento 3 se diseñó para determinar si la adición de PLG 100% activado a PLA al medio de fecundación, es decir la adición directa de PLA, producía un efecto semejante al del PLG sobre los resultados de FIV, lo que podría ser un primer indicio de que el efecto mediado por el PLG era debido a su activación a PLA por posibles activadores presentes en los gametos. Para ello, se fecundaron *in vitro* ovocitos bovinos y porcinos en 500 µl de medio FIV al que se añadieron, 30 minutos después de la adición de los espermatozoides, 0.4 U de PLA (136.36 µg/ml), o no se añadió nada (grupo control). Se realizaron 3

replicados con 50-60 ovocitos por grupo y se evaluaron las variables Penetración, Monospermia, Pronúcleo masculino, Esp/Ovocito, Pronúcleos masculinos, Descondensados y Esp/ZP.

Para conseguir el **Objetivo 2** (localizar al PLG y los PAs en los ovocitos bovinos y porcinos) se diseñó el experimento 4.

#### **5.10.4. Experimento 4. Inmunolocalización del PLG y sus activadores en ovocitos madurados *in vitro* bovinos y porcinos antes y después de ser fecundados**

Una vez comprobado que el sistema PLG-PLA afectaba a los resultados de fecundación, y dado que la presencia de PAs en las células espermáticas estaba más claramente demostrado que en los ovocitos, se diseñó un experimento con el objetivo de localizar el PLG y los PAs, mediante técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal, en los ovocitos bovinos y porcinos. En el **experimento 4.1** se procesaron ovocitos de ambas especies madurados *in vitro* y después de haber sido fecundados *in vitro*, para determinar si el PLG se localizaban en la ZP, en el oolema o en el ooplasma y si esta localización variaba tras la fecundación. En los **experimentos 4.2 y 4.3** se siguió el mismo protocolo de inmunocitoquímica pero empleando los anticuerpos anti-tPA y anti-uPA, en lugar del anti-PLG, respectivamente.

Una vez comprobada que la adición de PLG al medio de FIV tenía efecto y que el PLG y sus activadores estaban presentes en los ovocitos, los experimentos 5, 6, 7, 8 y 9 se diseñaron para intentar describir, al menos parcialmente, el posible mecanismo de acción del sistema y de este modo conseguir el **objetivo 3**.

#### **5.10.5. Experimento 5. Efecto del PLG sobre la resistencia de la ZP de ovocitos bovinos y porcinos a la digestión en pronasa**

Puesto que una de las vías por las que se regula la entrada del espermatozoide en el interior del ovocito es el incremento de la resistencia de la ZP a la digestión en pronasa, en el experimento 5 se evaluó dicha resistencia en ovocitos incubados en TALP con

ausencia o presencia de 1 U de PLG durante 30 minutos. Se emplearon grupos de 10-15 ovocitos en ambas especies y se realizaron 6 replicados en la especie bovina y 5 en la especie porcina.

#### **5.10.6. Experimento 6. Efecto de la PLA sobre la resistencia de la ZP de ovocitos porcinos a la digestión en pronasa**

Una vez comprobado que el zimógeno PLG no ejercía efecto sobre el endurecimiento de la ZP, a pesar de haber confirmado la presencia de PAs en el ovocito, nos planteamos si la adición directa de PLG activado (es decir de PLA) provocaba un aumento de la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa. Se evaluó dicha resistencia en ovocitos porcinos incubados en medio TALPp con ausencia o presencia de PLA (0.4 U) durante 30 minutos. Se emplearon grupos de 15 ovocitos y se realizaron 4 replicados. No se consideró necesario repetir el experimento con ovocitos bovinos porque consideramos que el efecto observado habría sido similar para ambas especies.

#### **5.10.7. Experimento 7. Efecto del PLG y la PLA sobre la viabilidad, capacitación y estabilidad acrosomal de los espermatozoides bovinos y porcinos**

Otro posible mecanismo de acción que explicara el efecto del PLG sobre los resultados de FIV podría ser la disminución de la viabilidad de los espermatozoides o los posibles efectos sobre la capacitación espermática o la reacción acrosómica. Para comprobar esta hipótesis, se incubaron espermatozoides procesados del mismo modo descrito para los experimentos de FIV en medio TALP durante 30 minutos en presencia o no de 0.5 U PLG y 0.4 U PLA y se evaluó la viabilidad, capacitación (**Experimento 7.1**) y estabilidad del acrosoma (**Experimento 7.2**) en el grupo control y los grupos experimentales mediante citometría de flujo.

#### **5.10.8. Experimento 8. Efecto de la PLA sobre la unión espermatozoide-ZP en las especies bovina y porcina**

Este experimento tuvo como objetivo averiguar si el PLG añadido al medio de FIV, al activándose y transformándose en PLA, podría “cortar”, mediante su efecto proteolítico,

las uniones primarias espermatozoide-ZP, explicando de este modo los resultados del experimento 1. En dicho experimento se había observado que cuanto más tarde se añadía el PLG, menor era el número de espermatozoides unidos a la ZP, lo cual era difícil de entender si tenemos en cuenta que el mayor número de uniones espermatozoide-ZP en el sistema de FIV empleado, se produce en los primeros 5-15 minutos, y el PLG en uno de los grupos, se adicionó 30 minutos después de añadir los espermatozoides. Por ello, se obtuvieron ZPs de ovocitos bovinos y porcinos madurados *in vitro* y se incubaron con espermatozoides siguiendo los protocolos de FIV descritos. Se evaluó el número medio de espermatozoides adheridos por ZP en cinco grupos de muestras:

- Grupo control 15': correspondiente a ZPs incubadas con espermatozoides durante 15 minutos. Sirvió para evaluar la adhesión inicial del espermatozoide a la ZP.

- Grupo control 3 horas: correspondiente a ZPs incubadas con espermatozoides durante 3 horas. Sirvió para evaluar el número de espermatozoides que, una vez adheridos, se desprenderían de su unión a ZP espontáneamente a las 3 horas.

- Grupo control 24 horas: correspondiente a ZPs incubadas con espermatozoides durante 24 horas. Sirvió para evaluar lo mismo que en el grupo anterior pero a las 24 horas.

- Grupo PLA 3 horas: correspondiente a ZPs incubadas con espermatozoides durante 3 horas a las que se había añadido 0.4 U PLA (136.36 µg/ml) a los 30 minutos del inicio de la incubación. Sirvió para evaluar la posibilidad de que la PLA pudiera haber roto algunas de las uniones espermatozoide-ZP a las 3 horas de incubación.

- Grupo PLA 24 horas: sirvió para evaluar el número de uniones rotas por la PLA a las 24 horas.

Se realizaron 3 replicados con un total de 40 ZPs por grupo en cada replicado.



#### **5.10.9. Experimento 9. Visualización en tiempo real del efecto de la adición de PLA sobre ovocitos fecundados**

Se comprobó el efecto en tiempo real de la adición de PLA a los ovocitos fecundados sobre la unión espermatozoide-ZP según la metodología descrita en el apartado 5.9. Se grabaron un total de 10 videos realizados sobre 10 ovocitos diferentes.

#### **5.11. Análisis estadístico**

En los experimentos 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8, los resultados de las variables estudiadas se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Todos los porcentajes (Penetración, Monospermia, Pronúcleo masculino, Espermatozoides vivos reaccionados, Espermatozoides vivos intactos, Espermatozoides muertos) fueron modelados acorde con el modelo binomial de variables. En estos experimentos los datos se analizaron con el programa SPSS versión 12. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el tratamiento aplicado en cada experimento como factor fijo. Para identificar las posibles diferencias significativas entre grupos se consideró  $p < 0.05$  como valor límite de corte. Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el test post hoc de Tukey.

En los experimentos 4 y 9 no se realizó análisis estadístico y únicamente se valoró la presencia o ausencia de marcaje con los anticuerpos empleados o si la adición de PLA rompía la unión de los espermatozoides a la ZP, respectivamente.

# Resultados

## Resultados

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Experimento 1. El efecto del PLG añadido al medio de cultivo sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina es dependiente del momento en el que se añade

En la especie bovina, la adición de plasminógeno (PLG) al medio de FIV en cualquiera de los tres tiempos estudiados tuvo un efecto significativo sobre la mayoría de los parámetros evaluados (Tablas 6.1 y 6.2). En líneas generales, se observó una disminución del porcentaje de penetración y del número medio de espermatozoides penetrados por ovocito. Esto conllevó un aumento en los porcentajes de monospermia. El efecto fue más marcado cuanto más tarde se añadió el PLG. El número medio de espermatozoides unidos a la ZP fue menor en el grupo al que se añadió el PLG 30 minutos después de la FIV (30' post-FIV) que en los otros dos grupos experimentales. También en este grupo el porcentaje de formación de pronúcleo masculino fue más bajo que en el resto.

**Tabla 6.1.** Efecto del plasminógeno (1 U) añadido al medio de fecundación a distintos tiempos sobre los porcentajes de penetración, monospermia y formación de pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

| Tratamiento  | Nº ovocitos | Penetración              | Monospermia             | Pronúcleo Masculino     |
|--------------|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control      | 225         | 94.22±1.56 <sup>a</sup>  | 71.70±3.10 <sup>a</sup> | 98.58±0.81 <sup>a</sup> |
| 30' pre-FIV  | 218         | 42.20±3.35 <sup>b</sup>  | 90.22±3.11 <sup>b</sup> | 93.48±2.59 <sup>a</sup> |
| 0'-FIV       | 222         | 33.78±3.18 <sup>bc</sup> | 92.00±3.15 <sup>b</sup> | 81.33±4.53 <sup>b</sup> |
| 30' post-FIV | 212         | 24.53±3.18 <sup>c</sup>  | 93.88±3.46 <sup>b</sup> | 68.33±6.05 <sup>c</sup> |

<sup>a, b, c</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 6.2.** Efecto del plasminógeno (1 U) añadido al medio de fecundación a distintos tiempos sobre el número y grado de descondensación de los espermatozoides en el interior de los ovocitos y el número de espermatozoides unidos a la ZP tras la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

| Tratamiento  | Esp/Ovocito            | Pronúcleos Masculinos   | Descondensados         | Esp/ZP                  |
|--------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Control      | 1.40±0.05 <sup>a</sup> | 1.34±0.05 <sup>a</sup>  | 0.06±0.02 <sup>a</sup> | 2.14±0.32 <sup>ab</sup> |
| 30' pre-FIV  | 1.11±0.04 <sup>b</sup> | 1.03±0.04 <sup>b</sup>  | 0.08±0.03 <sup>a</sup> | 2.64±0.39 <sup>a</sup>  |
| 0'-FIV       | 1.09±0.04 <sup>b</sup> | 0.85±0.05 <sup>bc</sup> | 0.24±0.06 <sup>b</sup> | 2.76±0.31 <sup>a</sup>  |
| 30' post-FIV | 1.06±0.03 <sup>b</sup> | 0.65±0.08 <sup>c</sup>  | 0.41±0.07 <sup>c</sup> | 0.96±0.27 <sup>b</sup>  |

<sup>a, b, c</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En la especie porcina, los resultados fueron muy similares (Tablas 6.3 y 6.4). Los porcentajes de penetración y el número medio de espermatozoides por ovocito disminuyeron en los grupos experimentales con respecto al grupo control, en mayor medida cuanto más tarde se adicionó el PLG al medio. Además, en esta especie se observó la misma tendencia para el número de espermatozoides unidos a la ZP. Los porcentajes de monospermia aumentaron también significativamente, en mayor medida cuanto más tarde se adicionó el PLG al medio. Los porcentajes de formación de pronúcleos masculinos no se vieron modificados por el tratamiento.

**Tabla 6.3.** Efecto del plasminógeno (1 U) añadido al medio de fecundación a distintos tiempos sobre los porcentajes de penetración, monospermia y formación de pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

| Tratamiento  | Nº ovocitos | Penetración             | Monospermia              | Pronúcleo Masculino |
|--------------|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| Control      | 177         | 94.35±1.74 <sup>a</sup> | 19.16±3.06 <sup>a</sup>  | 96.40±1.44          |
| 30' pre-FIV  | 197         | 61.42±3.48 <sup>b</sup> | 33.88±4.32 <sup>ab</sup> | 97.52±1.42          |
| 0'-FIV       | 184         | 59.78±3.63 <sup>b</sup> | 41.82±4.73 <sup>bc</sup> | 98.18±1.28          |
| 30' post-FIV | 199         | 43.72±3.53 <sup>c</sup> | 50.57±5.39 <sup>c</sup>  | 97.70±1.62          |

<sup>a, b, c</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 6.4.** Efecto del plasminógeno (1 U) añadido al medio de fecundación a distintos tiempos sobre el número y grado de descondensación de los espermatozoides en el interior de los ovocitos y el número de espermatozoides unidos a la ZP tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

| Tratamiento  | Esp/Ovocito            | Pronúcleos Masculinos  | Descondensados         | Esp/ZP                   |
|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| Control      | 3.94±0.22 <sup>a</sup> | 2.82±0.14 <sup>a</sup> | 1.12±0.15 <sup>a</sup> | 23.58±1.84 <sup>a</sup>  |
| 30' pre-FIV  | 2.31±0.11 <sup>b</sup> | 2.06±0.10 <sup>b</sup> | 0.25±0.06 <sup>b</sup> | 16.45±1.19 <sup>b</sup>  |
| 0'-FIV       | 2.26±0.13 <sup>b</sup> | 2.06±0.11 <sup>b</sup> | 0.20±0.05 <sup>b</sup> | 12.02±1.14 <sup>bc</sup> |
| 30' post-FIV | 1.79±0.12 <sup>b</sup> | 1.68±0.09 <sup>b</sup> | 0.11±0.07 <sup>b</sup> | 6.51±0.82 <sup>c</sup>   |

<sup>a, b, c</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

## 6.2. Experimento 2. El efecto del PLG añadido al medio de fecundación sobre los resultados de FIV en las especies bovina y porcina depende de la dosis empleada

Cuando la dosis de PLG añadida al medio de fecundación se redujo a la mitad (0.5 U) y a la cuarta parte (0.25 U) de la utilizada en el experimento 1 (1 U), los resultados indicaron diferencias entre grupos. En la especie bovina, la tendencia fue la misma que la observada en el experimento 1, observándose menores porcentajes de penetración y número medio de espermatozoides por ovocito en los grupos con PLG añadido que en el grupo control (Tablas 6.5 y 6.6). En esta ocasión, el número medio de espermatozoides unidos a la ZP también disminuyó al añadir PLG. Los porcentajes de formación de pronúcleos masculinos disminuyeron ligeramente por efecto del tratamiento.

En la especie porcina, de nuevo los datos fueron muy semejantes a los obtenidos en la especie bovina, corroborando que el PLG produce una disminución en el número de espermatozoides que se unen a la ZP y que son capaces de penetrar los ovocitos, aumentando por tanto los porcentajes de monospermia (Tablas 6.7 y 6.8). Este efecto fue claramente dosis-dependiente.

**Tabla 6.5.** Efecto del plasminógeno añadido al medio de fecundación a diferentes concentraciones (0.25 U y 0.5 U) sobre los porcentajes de penetración, monospermia y formación de pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

| Tratamiento  | Nº ovocitos | Penetración             | Monospermia              | Pronúcleo Masculino      |
|--------------|-------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control      | 156         | 93.59±1.97 <sup>a</sup> | 82.88±3.13 <sup>a</sup>  | 100.0±0.0 <sup>a</sup>   |
| PLG (0.25 U) | 154         | 60.39±3.95 <sup>b</sup> | 91.40±2.92 <sup>ab</sup> | 97.85±1.51 <sup>ab</sup> |
| PLG (0.5 U)  | 152         | 37.50±3.94 <sup>b</sup> | 100.0±0.00 <sup>b</sup>  | 94.74±2.98 <sup>b</sup>  |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 6.6.** Efecto del plasminógeno añadido al medio de fecundación a diferentes concentraciones (0.25 U y 0.5 U) sobre el número y grado de descondensación de los espermatozoides en el interior de los ovocitos y el número de espermatozoides unidos a la ZP tras la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

| Tratamiento  | Esp/Ovocito             | Pronúcleos Masculinos  | Descondensados | Esp/ZP                 |
|--------------|-------------------------|------------------------|----------------|------------------------|
| Control      | 1.27±0.05 <sup>a</sup>  | 1.23±0.05 <sup>a</sup> | 0.04±0.02      | 2.81±0.26 <sup>a</sup> |
| PLG (0.25 U) | 1.12±0.04 <sup>ab</sup> | 1.1±0.05 <sup>ab</sup> | 0.02±0.02      | 1.56±0.14 <sup>b</sup> |
| PLG (0.5 U)  | 1.0±0.0 <sup>b</sup>    | 0.95±0.03 <sup>b</sup> | 0.05±0.03      | 0.99±0.10 <sup>b</sup> |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 6.7.** Efecto del plasminógeno añadido al medio de fecundación a diferentes concentraciones (0.25 U y 0.5 U) sobre los porcentajes de penetración, monospermia y formación de pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

| Tratamiento  | Nº ovocitos | Penetración              | Monospermia             | Pronúcleo Masculino |
|--------------|-------------|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| Control      | 132         | 94.70±1.96 <sup>a</sup>  | 0 <sup>a</sup>          | 94.70±2.25          |
| PLG (0.25 U) | 131         | 85.50±3.10 <sup>ab</sup> | 0.89±0.89 <sup>a</sup>  | 100.00              |
| PLG (0.5 U)  | 128         | 73.44±3.91 <sup>b</sup>  | 39.36±5.07 <sup>b</sup> | 95.74±2.09          |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 6.8.** Efecto del plasminógeno añadido al medio de fecundación a diferentes concentraciones (0.25 U y 5 U) sobre el número y grado de descondensación de los espermatozoides en el interior de los ovocitos y el número de espermatozoides unidos a la ZP tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

| Tratamiento | Esp/Ovocito             | Pronúcleos<br>Masculinos | Descondensados          | Esp/ZP                  |
|-------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control     | 21.54±0.45 <sup>a</sup> | 5.46±0.14 <sup>a</sup>   | 16.03±0.36 <sup>a</sup> | 84.73±1.59 <sup>a</sup> |
| PLG (2.5 U) | 10.18±0.53 <sup>b</sup> | 2.91±0.88 <sup>b</sup>   | 7.27±0.50 <sup>b</sup>  | 36.10±1.89 <sup>b</sup> |
| PLG (5 U)   | 2.33±0.16 <sup>c</sup>  | 1.95±0.10 <sup>c</sup>   | 0.38±0.10 <sup>c</sup>  | 16.85±0.83 <sup>c</sup> |

<sup>a, b, c</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

### 6.3. Experimento 3. La adición de PLA (0.4 U) al medio de cultivo afecta a los resultados de FIV en las especies bovina y porcina

En la especie bovina, cuando se adicionó plasmina (PLA) (forma activa del plasminógeno) al medio de fecundación 30 minutos después de añadir los espermatozoides, se observó una disminución del porcentaje de penetración (Tabla 6.9), al igual que había ocurrido en los experimentos 1 y 2 con la adición de plasminógeno. Sin embargo, al contrario de lo ocurrido en estos mismos experimentos, no se observaron diferencias significativas en el resto de parámetros evaluados (Tabla 6.10).

En la especie porcina, los resultados fueron similares a los obtenidos con plasminógeno en los experimentos 1 y 2, pero el aumento de la monospermia fue especialmente marcado, suponiendo una diferencia del 63% con respecto al grupo control, en el que en esta ocasión todos los ovocitos penetrados fueron polispermicos (Tabla 6.11). Esto se debió al elevado número medio de espermatozoides que se unieron a la ZP y que penetraron en cada ovocito en el grupo control, en comparación con el grupo tratado con plasmina (Tabla 6.12).



**Tabla 6.9.** Efecto de la plasmina añadida al medio de fecundación (0.4 U) sobre los porcentajes de penetración, monospermia y formación de pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

| Tratamiento | Nº ovocitos | Penetración             | Monospermia | Pronúcleo Masculino |
|-------------|-------------|-------------------------|-------------|---------------------|
| Control     | 136         | 94.85±1.90 <sup>a</sup> | 84.5±3.19   | 100                 |
| PLA (0.4 U) | 137         | 72.99±3.8 <sup>b</sup>  | 87.0±3.38   | 100                 |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 6.10.** Efecto de la plasmina añadida al medio de fecundación (0.4 U) sobre el número y grado de descondensación de los espermatozoides en el interior de los ovocitos y el número de espermatozoides unidos a la ZP tras la fecundación *in vitro* en la especie bovina.

| Tratamiento | Esp/Ovocito | Pronúcleos Masculinos | Descondensados | Esp/ZP    |
|-------------|-------------|-----------------------|----------------|-----------|
| Control     | 1.24±0.05   | 1.21±0.05             | 0.03±0.02      | 2.57±0.26 |
| PLA (0.4 U) | 1.15±0.04   | 1.15±0.04             | 0              | 2.08±0.17 |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 6.11.** Efecto de la plasmina añadida al medio de fecundación (0.4 U) sobre los porcentajes de penetración, monospermia y formación de pronúcleo masculino tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

| Tratamiento | Nº ovocitos | Penetración             | Monospermia             | Pronúcleo Masculino |
|-------------|-------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| Control     | 117         | 94.02±2.20 <sup>a</sup> | 0 <sup>a</sup>          | 97.02±2.20          |
| PLA (0.4 U) | 116         | 61.21±4.54 <sup>b</sup> | 63.38±5.75 <sup>b</sup> | 100                 |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 6.12.** Efecto de la plasmina añadida al medio de fecundación (0.4 U) sobre el número y grado de descondensación de los espermatozoides en el interior de los ovocitos y el número de espermatozoides unidos a la ZP tras la fecundación *in vitro* en la especie porcina.

| Tratamiento | Esp/Ovocito             | Pronúcleos Masculinos  | Descondensados          | Esp/ZP                  |
|-------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control     | 21.11±0.48 <sup>a</sup> | 5.30±0.14 <sup>a</sup> | 15.75±0.39 <sup>a</sup> | 86.03±1.67 <sup>a</sup> |
| PLA (0.4 U) | 1.61±0.11 <sup>b</sup>  | 1.55±0.09 <sup>b</sup> | 0.07±0.03 <sup>b</sup>  | 5.19±0.34 <sup>b</sup>  |

<sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05)

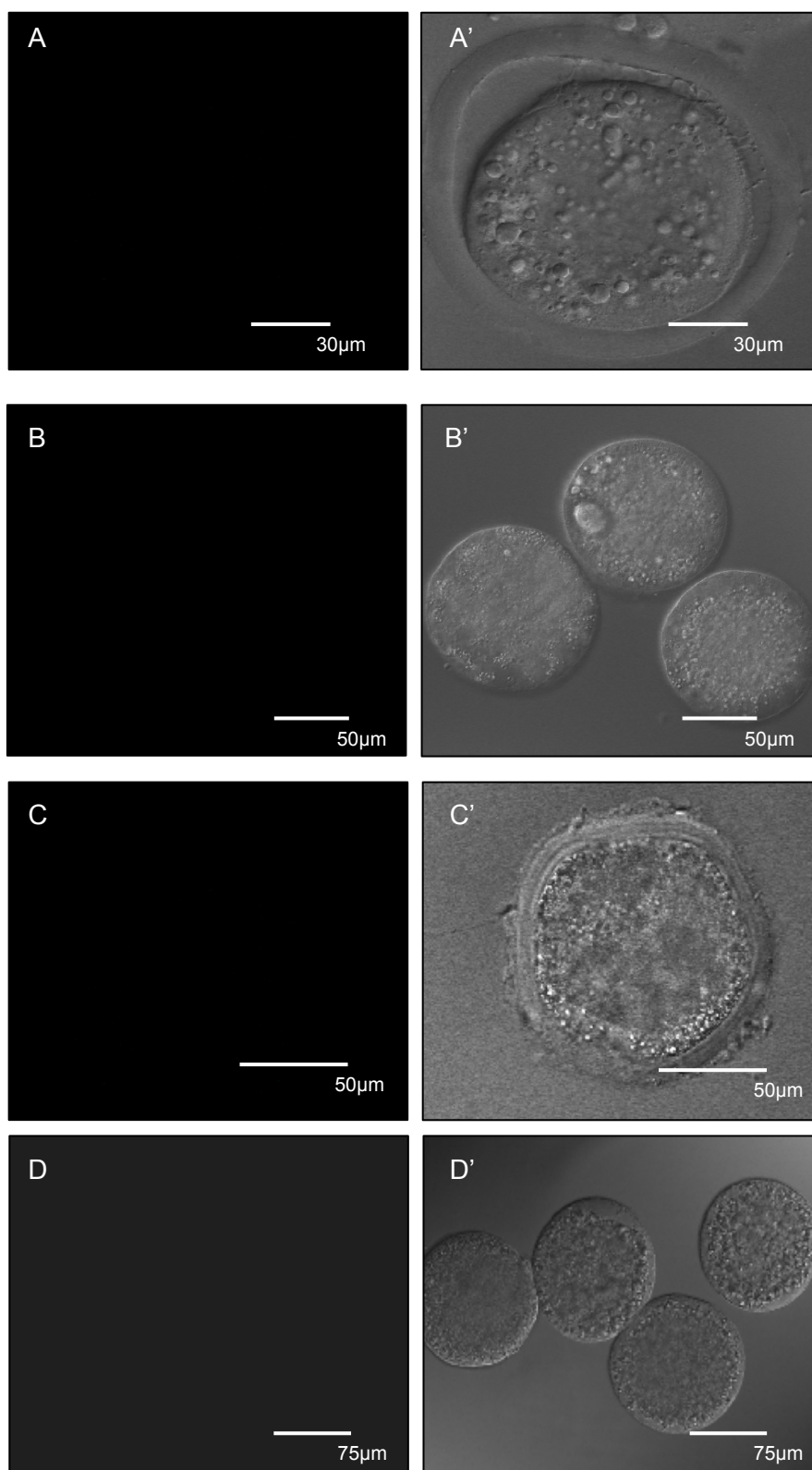
#### **6.4. Experimento 4. La inmunolocalización del PLG y sus activadores en ovocitos madurados *in vitro* bovinos y porcinos se ve afectada por la fecundación**

##### **6.4.1. Experimento 4.1 Inmunolocalización del PLG**

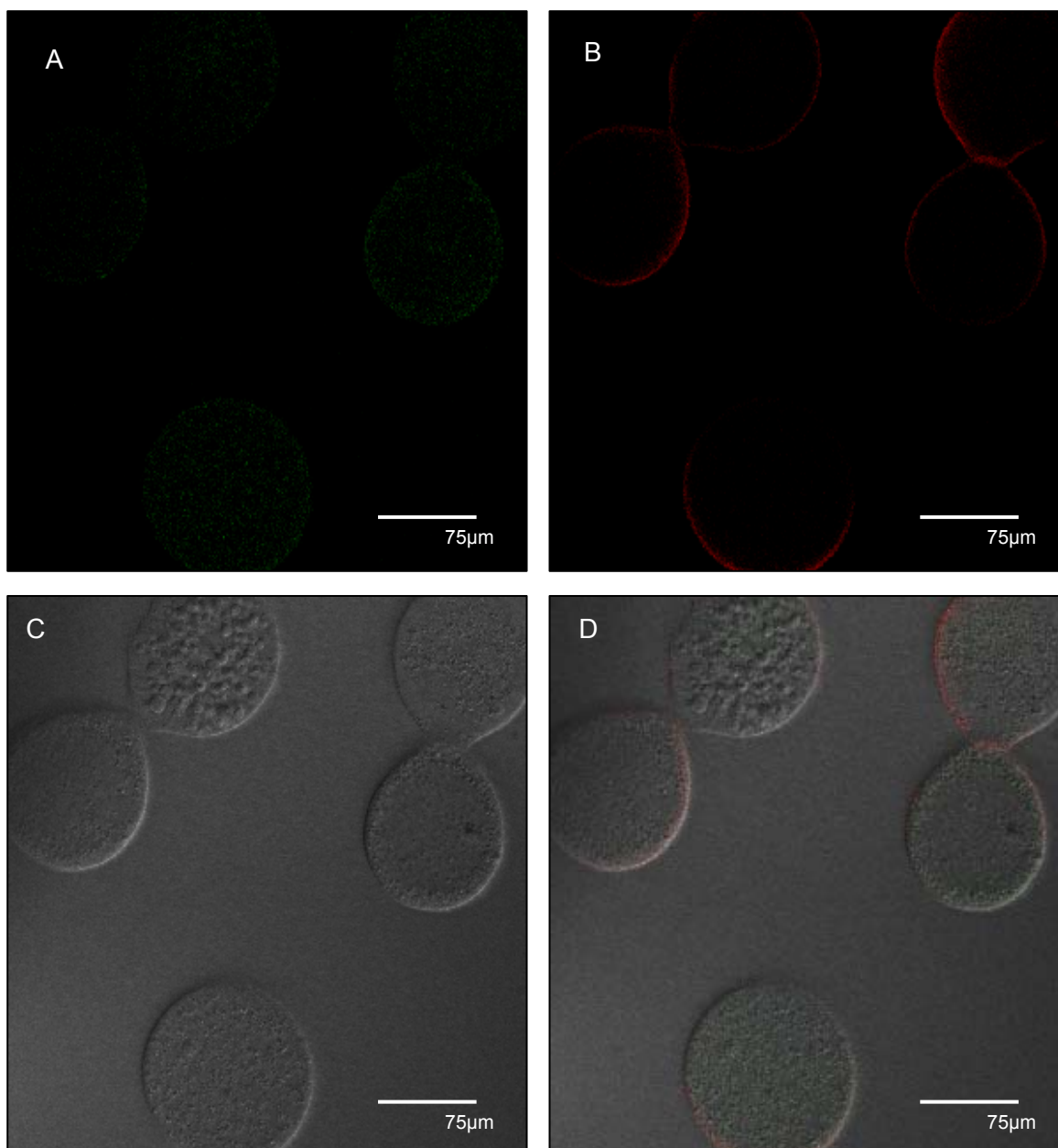
Los controles realizados incubando ovocitos únicamente con el anticuerpo (Ac) secundario anti-IgG de conejo-TRITC demostraron que este Ac, en ausencia del Ac primario, no se une a los ovocitos bovinos ni porcinos ya estén madurados o fecundados e independientemente de que estuviera presente o no la ZP. Como resumen de estos resultados mostramos la ausencia de fluorescencia en distintos tipos de ovocitos bovinos (Figura 6.1).

La incubación de las muestras se realizó con un anticuerpo primario anti-PLG y un secundario anti-IgG de conejo-TRITC. En ovocitos bovinos madurados *in vitro*, el marcaje con anticuerpo anti-PLG y TRITC reveló la presencia de plasminógeno en la periferia del ooplasma y proximidades de la membrana plasmática (Figura 6.2) y también en la ZP (Figura 6.3). Con la lectina LCA, se observó el patrón de distribución de GCs característico de los ovocitos en MII, que aparecieron como un punteado disperso por todo el citoplasma (Figura 6.2 A y D)

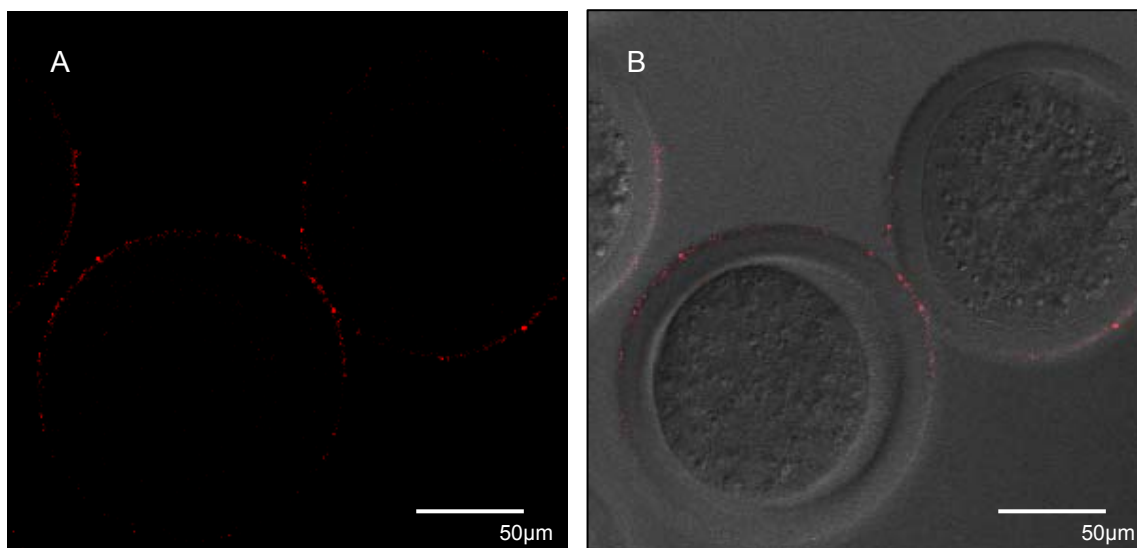
**Figura 6.1.** Ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* incubados únicamente con Ac anti-IgG de conejo-TRITC. A-A') Ovocito madurado *in vitro* procesado con ZP. B-B') Ovocitos madurados *in vitro* procesados sin ZP. C-C') Ovocito madurado y fecundado *in vitro* procesado con ZP. D-D') Ovocitos madurados y fecundados *in vitro* procesados sin ZP.



**Figura 6.2.** Ovocitos bovinos madurados *in vitro* marcados con Ac anti-PLG tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con LCA-FITC. B) Marcaje con anti-PLG y TRITC. C) Imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos. D) Resultado de la superposición de las tres imágenes anteriores.

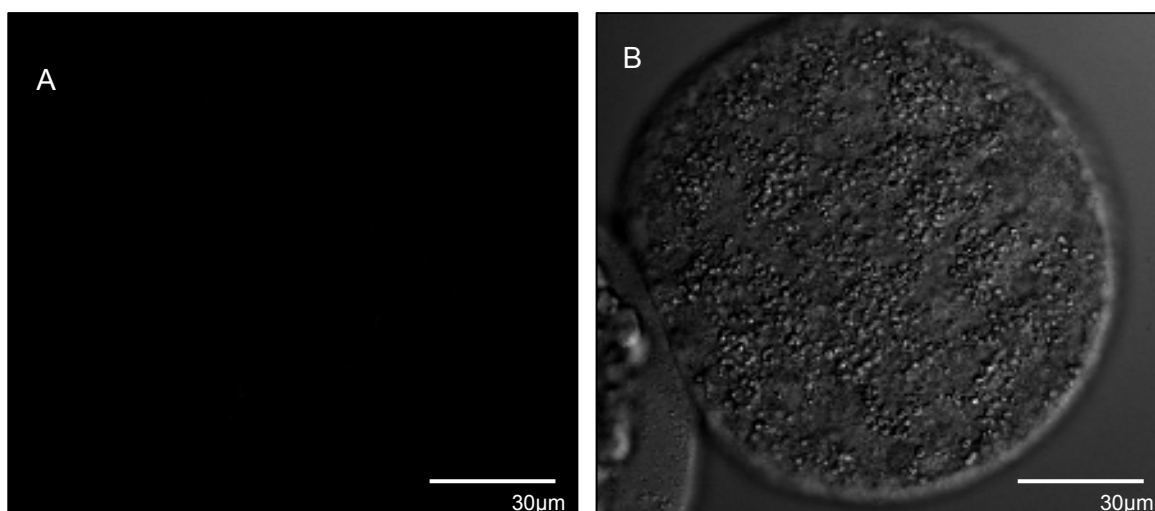


**Figura 6.3.** Ovocitos bovinos madurados in vitro marcados con Ac anti-PLG, sin eliminar la ZP y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a ovocitos marcados con anti-PLG y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.

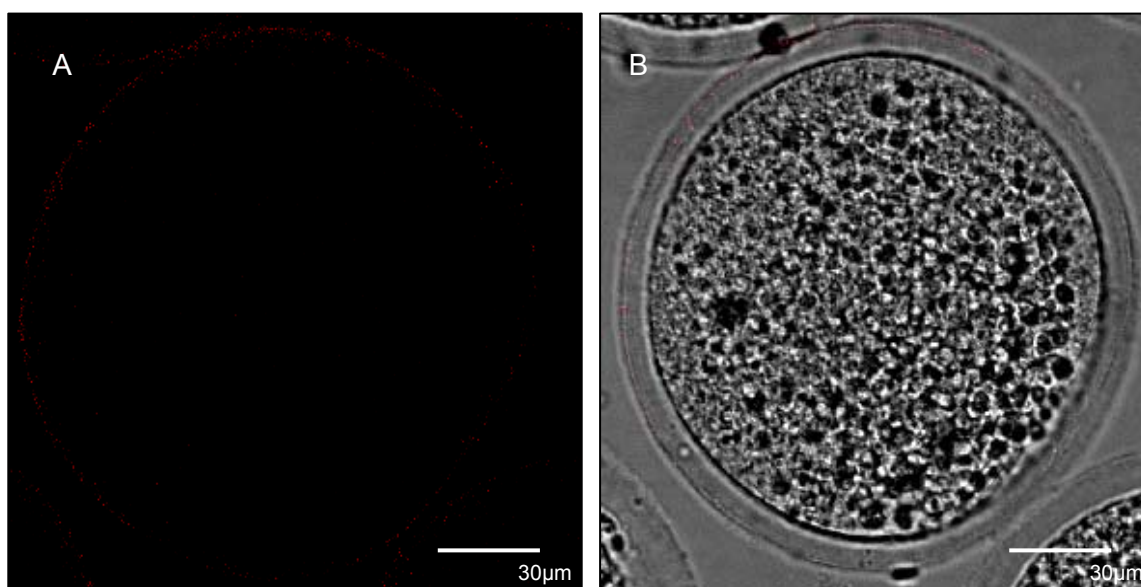


Tras la fecundación no se observó marcaje del anticuerpo anti-PLG en la periferia del ooplasma de los ovocitos bovinos (Figura 6.4), mientras que en la ZP se evidenció una leve señal (Figura 6.5).

**Figura 6.4.** Ovocito bovino madurado *in vitro* y posteriormente fecundado, marcado con Ac anti-PLG, tras eliminar la ZP con pronasa y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-PLG y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.

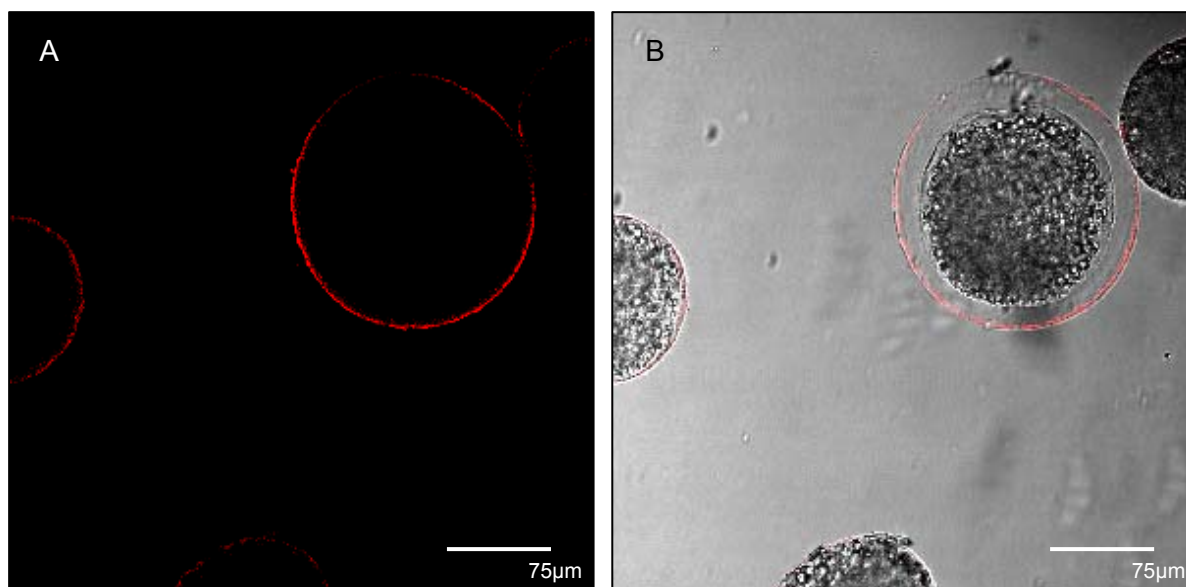


**Figura 6.5.** Ovocito bovino madurado *in vitro* y posteriormente fecundado, marcado con Ac anti-PLG, sin eliminar la ZP y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-PLG y TRITC B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



Con los ovocitos porcinos, el marcaje con anti-PLG antes de la fecundación se observó claramente tanto en la ZP como en la periferia del ooplasma y proximidades de la membrana plasmática (Figura 6.6). Cuando se marcaron simultáneamente los ovocitos con anti-PLG y lectina PNA para localizar la zona ocupada por gránulos corticales, se observó que la región marcada por esta lectina está cercana a la zona marcada con el Ac anti-plasminógeno (Figura 6.7). Puesto que la captura de las imágenes no se realizó de modo secuencial, no pudimos calcular los índices de colocalización que nos habrían permitido discernir al cien por cien la coincidencia del marcaje de los dos fluorocromos.

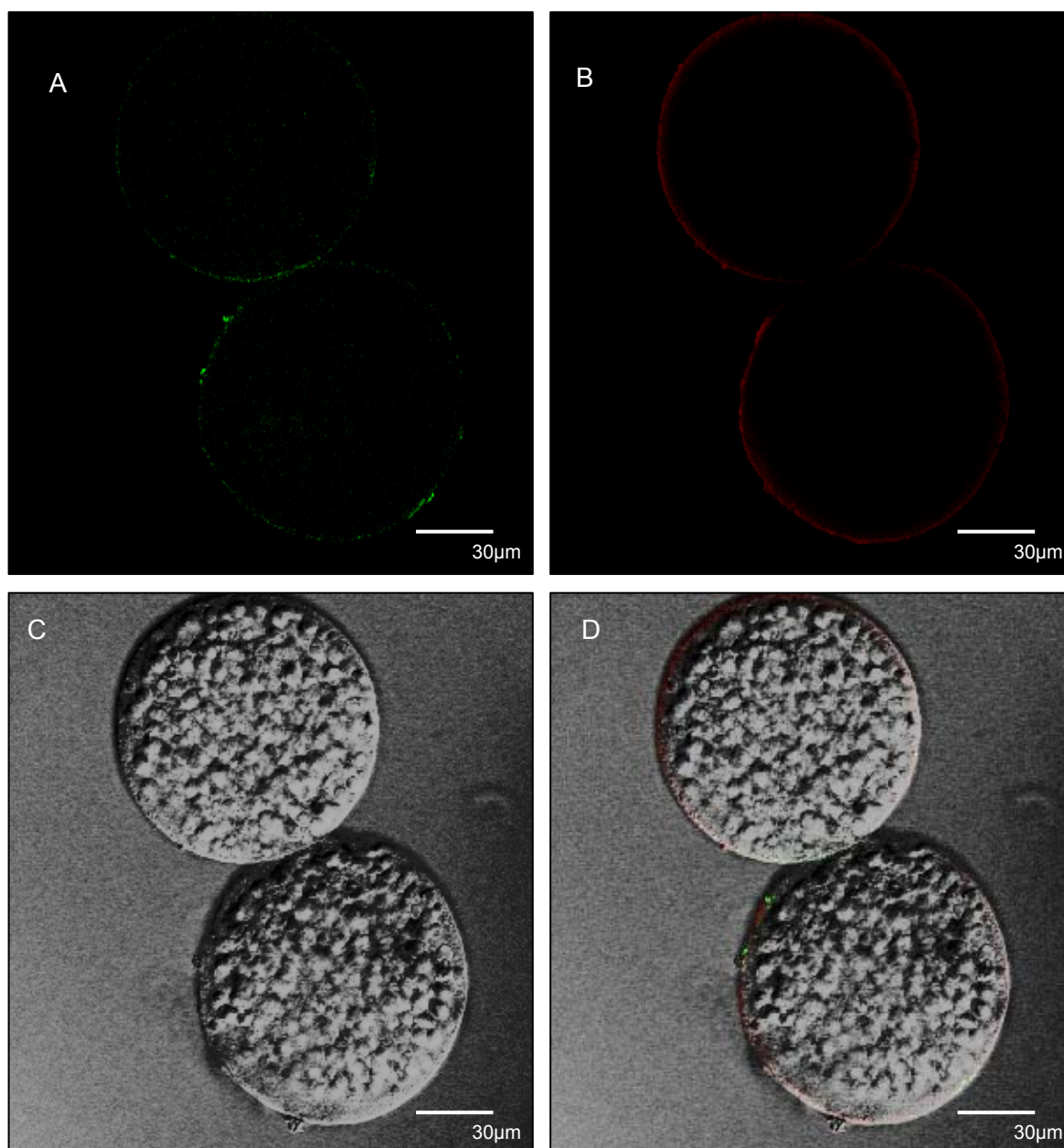
**Figura 6.6.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro*, marcados con Ac anti-PLG y observados en microscopio confocal. Se han montado sobre el mismo portaobjetos ovocitos con y sin ZP eliminada con pronasa. A) Marcaje con anti-PLG y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.





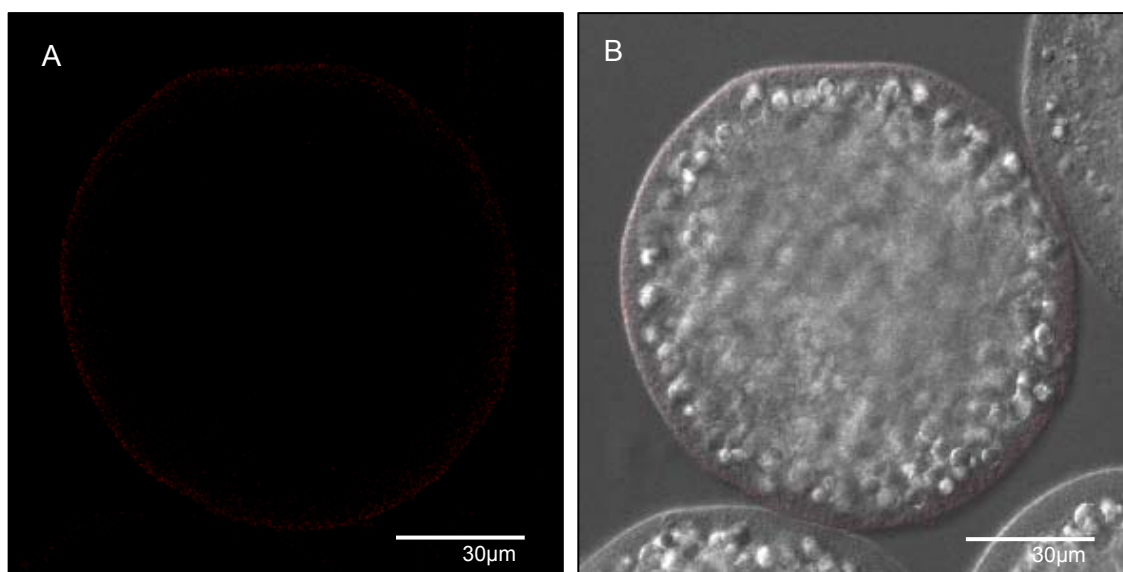
**Figura 6.7.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro*, marcados simultáneamente con Ac anti-PLG y PNA-FITC tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal.

A) Imagen correspondiente a dos ovocitos marcados con PNA-FITC. B) Marcaje con anti-PLG y TRITC. C) Imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos. D) Resultado de la superposición de las tres imágenes anteriores.

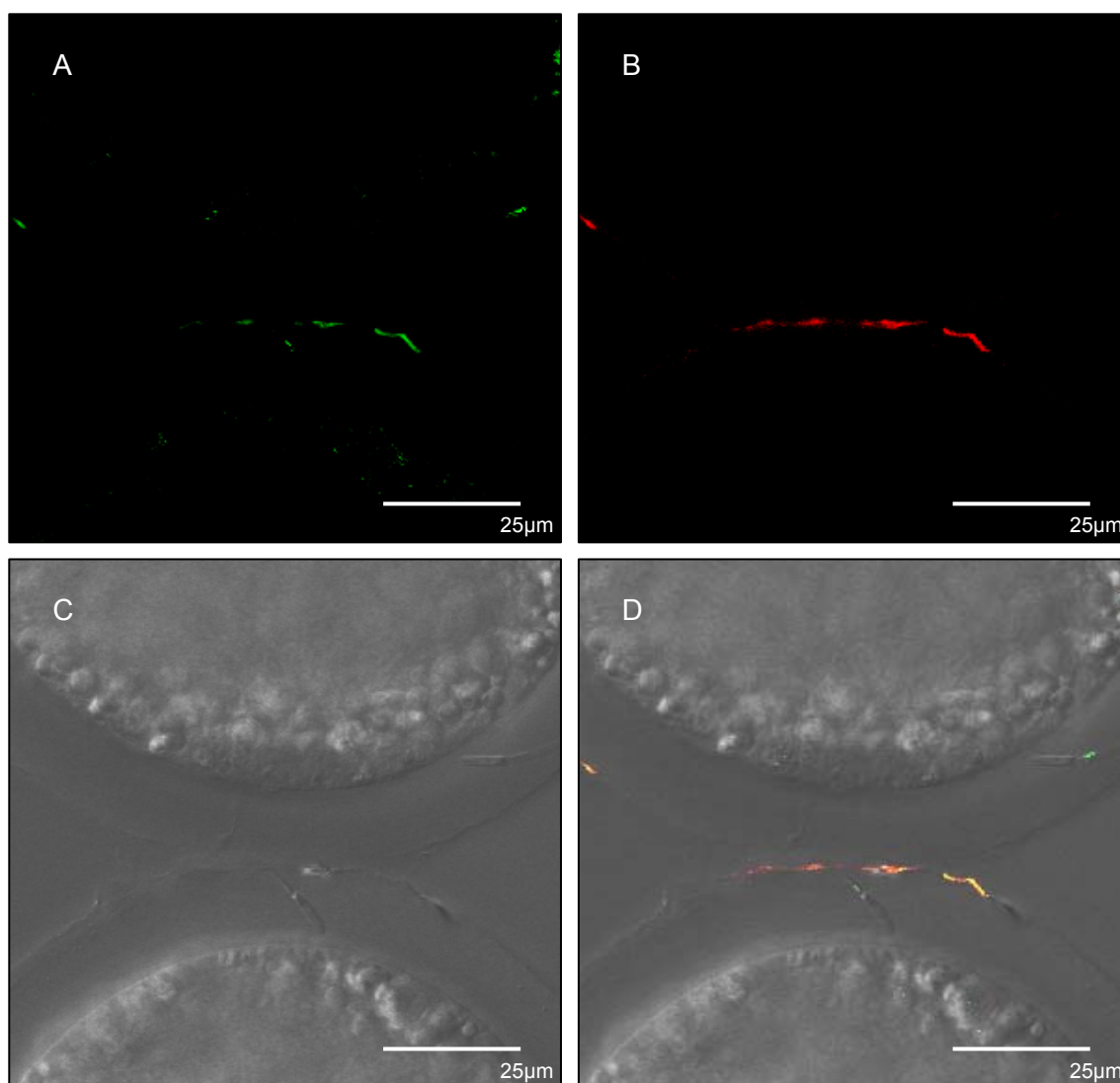


Tras la fecundación, el marcaje con anti-PLG no fue visible en la región del oolema de la mayoría (75%) de los ovocitos, aunque en algunos de ellos (25%) continuó observándose (Figura 6.8). En cuanto a la ZP, el marcaje con anti-PLG-TRITC continuó siendo levemente visible en la misma tras la fecundación, aunque apareció circunscrito a los lugares donde aparecían espermatozoides adheridos (Figura 6.9), con un patrón muy diferente al que habíamos observado en los ovocitos no fecundados (Figura 6.6). En los ovocitos fecundados también se observó marcaje con PNA en el exterior de la ZP debido a la presencia de contenido acrosomal sobre la misma, pero se observa ausencia de marcaje de GCs ya que los ovocitos están fecundados y ya se ha producido la reacción cortical.

**Figura 6.8.** Ovocitos porcinos madurados y fecundados *in vitro*, marcados con Ac anti-PLG tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Marcaje con anti-PLG y TRITC. B). Resultado de la superposición de la imagen anterior y la de luz transmitida de los mismos ovocitos.



**Figura 6.9.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro* y posteriormente fecundados, marcados simultáneamente con Ac anti-plasminógeno y PNA-FITC sin eliminar la ZP y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a dos ovocitos marcados con PNA-FITC. B) Marcaje con anti-PLG y TRITC de los mismos ovocitos. C) Imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos. D) Resultado de la superposición de las tres imágenes anteriores.

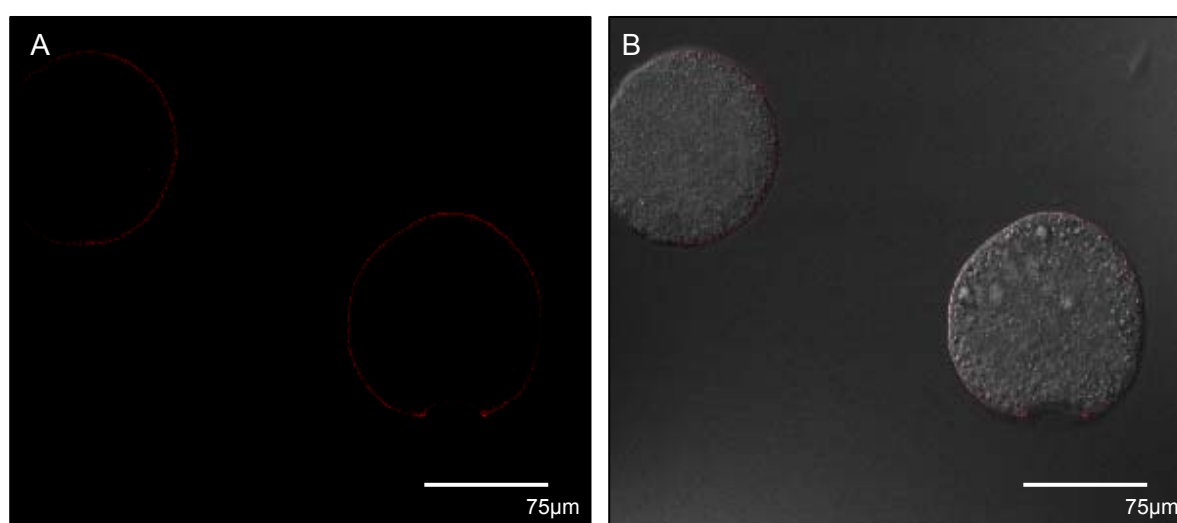


#### 6.4.2. Experimento 4.2. Inmunolocalización de tPA

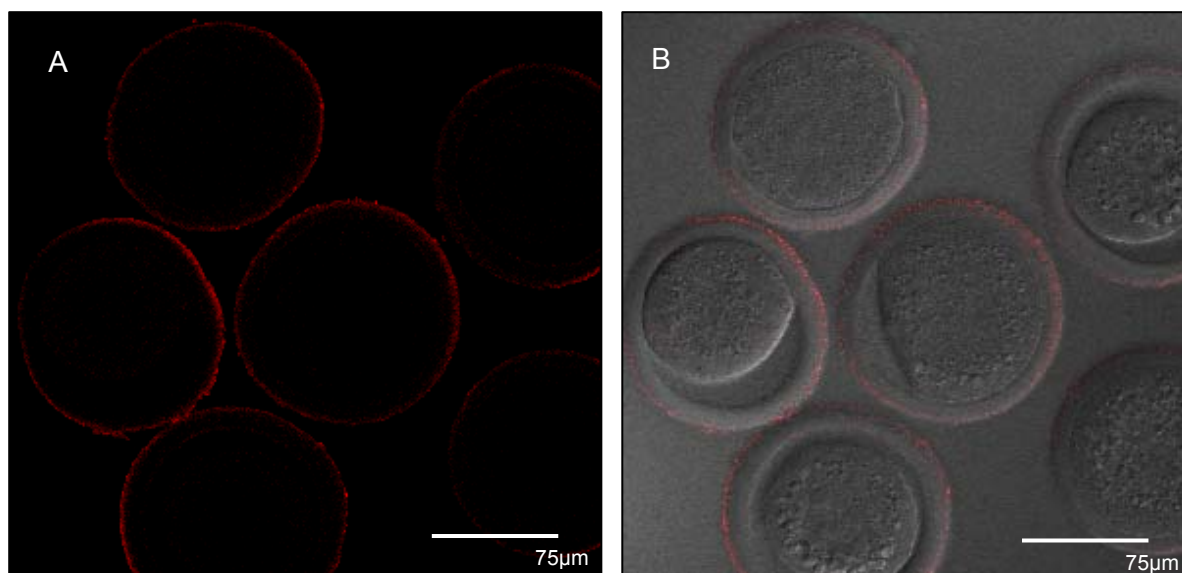
En los ovocitos bovinos madurados *in vitro*, el tPA se inmunolocalizó en la región que podría corresponder a la membrana plasmática (Figura 6.10) y en todo el espesor de la ZP, con intensidad creciente desde el interior hacia el exterior de la misma (Figura 6.11) antes de la fecundación. Esta localización no se evidenció claramente en la zona próxima al corpúsculo polar en aquellas imágenes que, por su posición espacial, permitieron su observación en el ovocito (Figura 6.10).

Tras la fecundación, el marcaje de anti-tPA desapareció por completo de la proximidad de la membrana plasmática (Figura 6.12) y en la ZP disminuyó marcadamente (Figura 6.13) en comparación con el marcaje en ZP de ovocitos no fecundados.

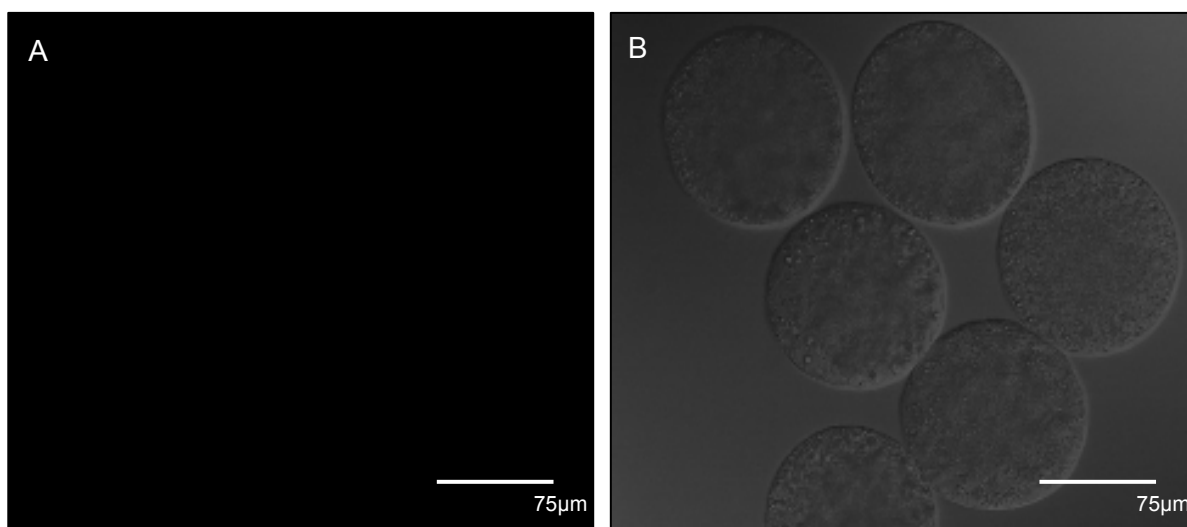
**Figura 6.10.** Ovocitos bovinos madurados *in vitro* marcados con anticuerpo anti-tPA tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con anti-tPA y TRITC. En el ovocito situado abajo a la derecha se observa cómo el marcaje del anticuerpo desaparece en la zona correspondiente al lugar de extrusión del corpúsculo polar. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos.



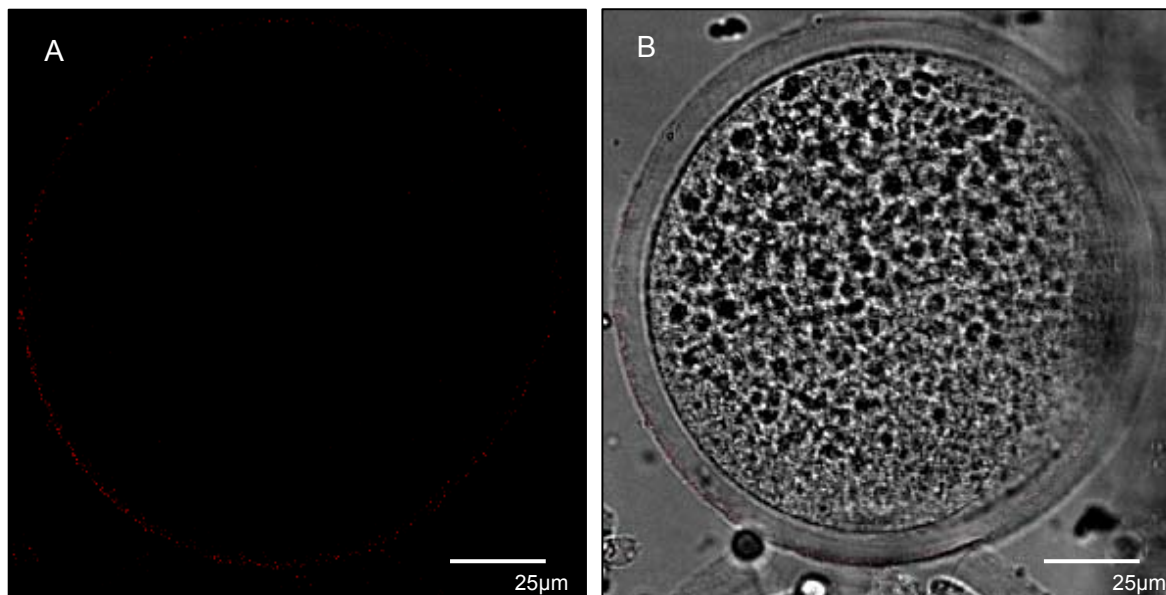
**Figura 6.11.** Ovocitos bovinos madurados *in vitro* marcados con anticuerpo anti-tPA sin eliminar la ZP y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con anti-tPA y TRITC, en la que la señal se observa en la región más externa de la ZP. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos.



**Figura 6.12.** Ovocitos bovinos madurados *in vitro* y posteriormente fecundados *in vitro*, marcados con anticuerpo anti-tPA tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con anti-tPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos.



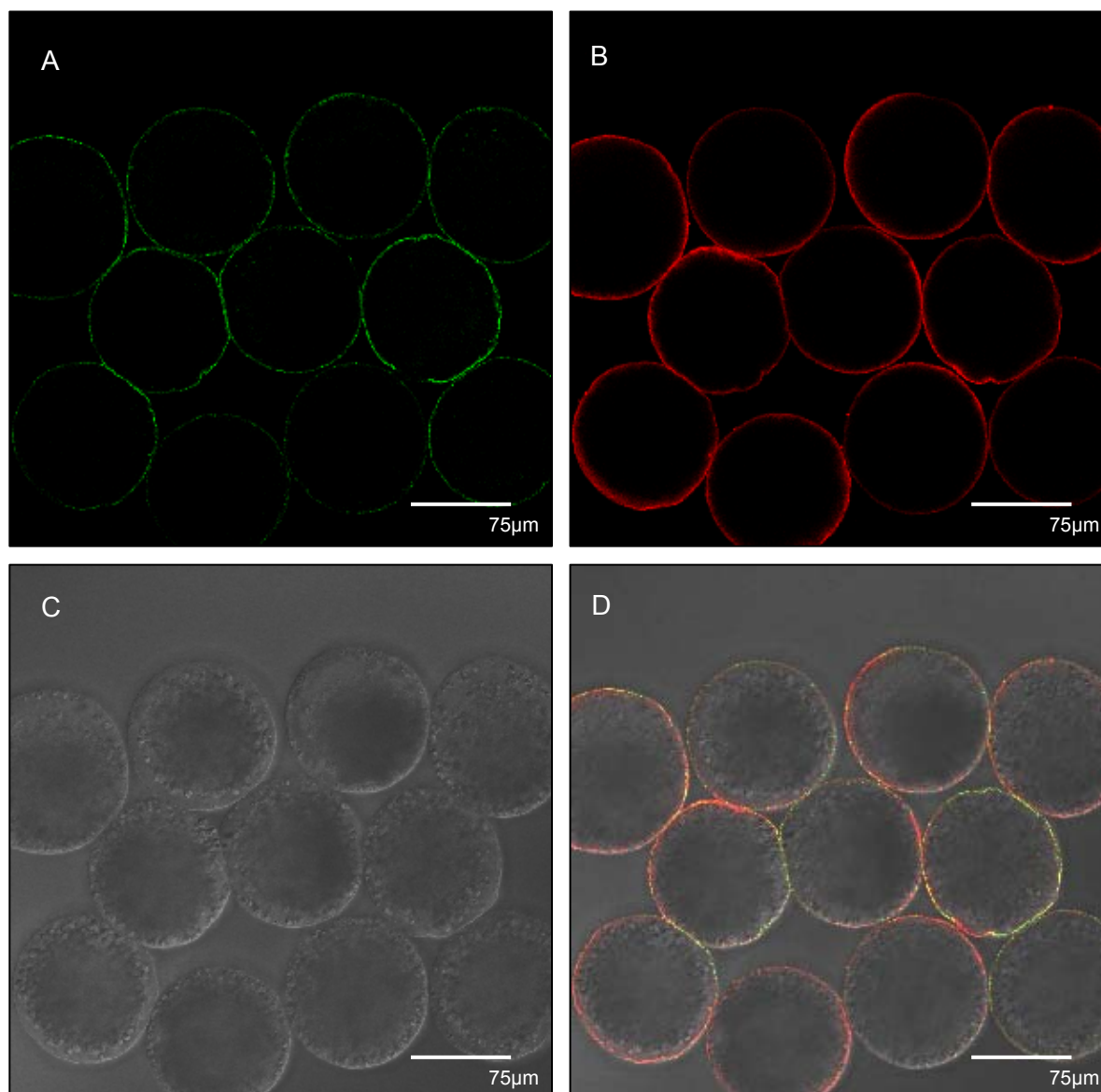
**Figura 6.13.** Ovocitos bovinos madurados *in vitro* y posteriormente fecundados *in vitro*, marcados con anticuerpo anti-tPA sin eliminar la ZP y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con anti-tPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



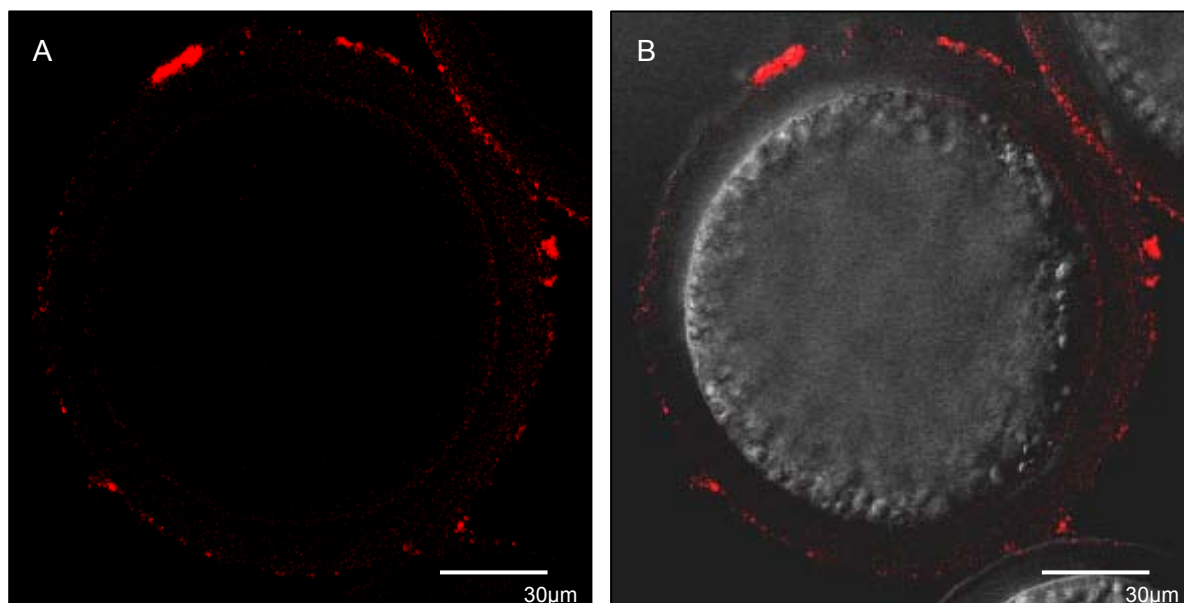
En los ovocitos porcinos madurados *in vitro* el tPA se inmunolocalizó, al igual que en la especie bovina, en la región que podría corresponder a la membrana plasmática. En algunos tramos, el marcaje anti-tPA coincidió espacialmente, en las proximidades del oolema, con el de la lectina PNA, que en el cerdo se considera específica para gránulos corticales (Figura 6.14), aunque serían necesarios estudios de colocalización para conocer con exactitud si ambos fluorocromos coinciden en la misma zona. Cuando los ovocitos se procesaron con la ZP, también se observó marcaje del anticuerpo anti-tPA en la parte más externa de la misma (Figura 6.15).



**Figura 6.14.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro* marcados simultáneamente con anticuerpo anti-tPA y PNA-FITC tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a ovocitos marcados con PNA-FITC. B) Marcaje con anti-tPA y TRITC. C) Imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos. D) Resultado de la superposición de las tres imágenes anteriores.



**Figura 6.15.** Ovocito porcino madurado *in vitro* marcado con anticuerpo anti-tPA sin eliminar la ZP y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a un ovocito marcado con anti-tPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.

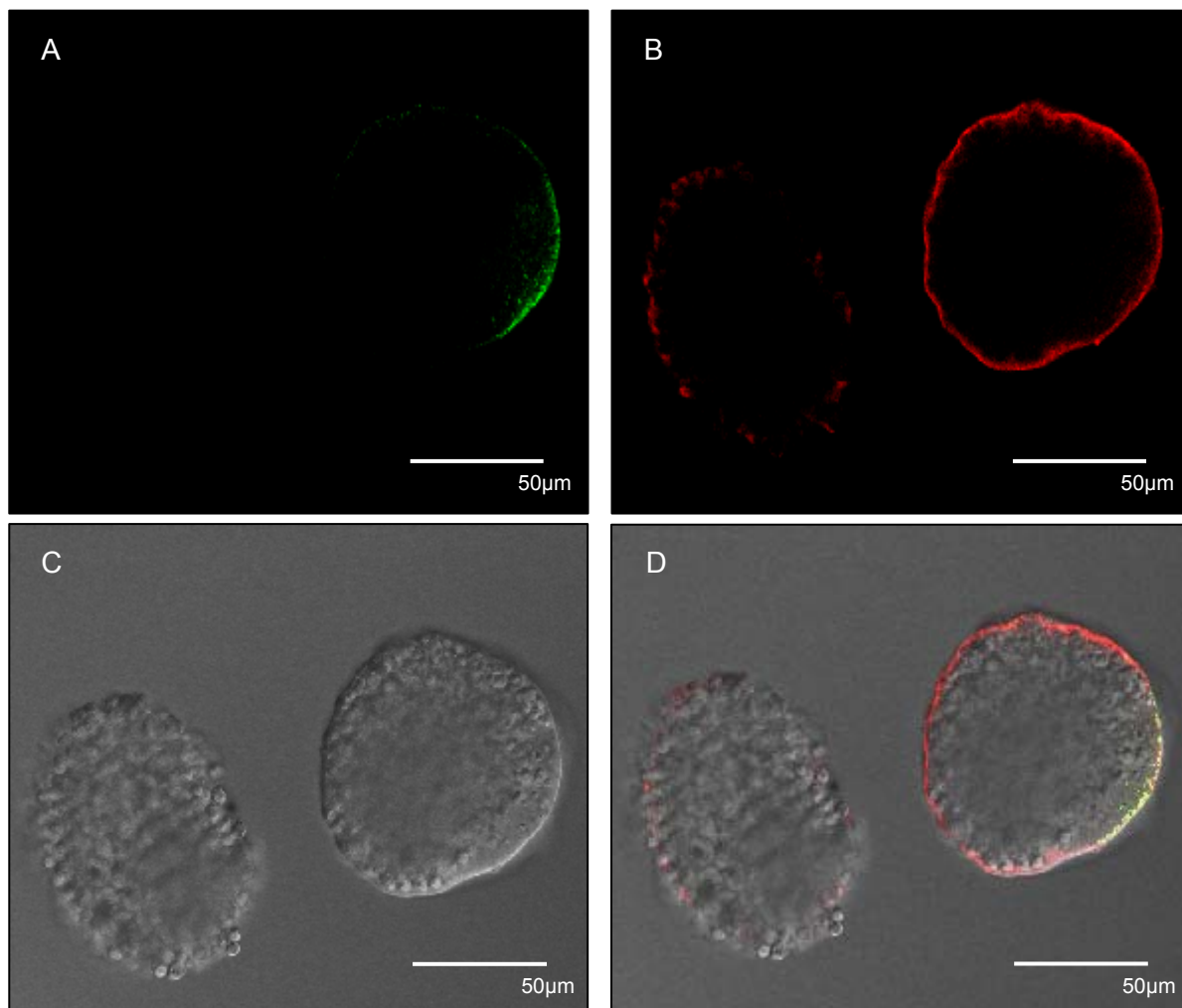


Tras la fecundación, el marcaje con tPA desapareció parcialmente de la membrana plasmática de los ovocitos porcinos (Figura 6.16), observándose que este marcaje era menos intenso que el de los ovocitos no fecundados (Figura 6.14). Además, gracias al marcaje simultáneo de los ovocitos fecundados con PNA-FITC y anti-tPA-TRITC, podemos observar en la misma figura 6.16 que la desaparición gradual del marcaje anti-tPA ocurre en los ovocitos fecundados (ausencia de gránulos corticales y por tanto de marcaje PNA-FITC), mientras que en los ovocitos no fecundados (presencia de gránulos corticales y por tanto de marcaje PNA-FITC) la señal de tPA no desaparece.

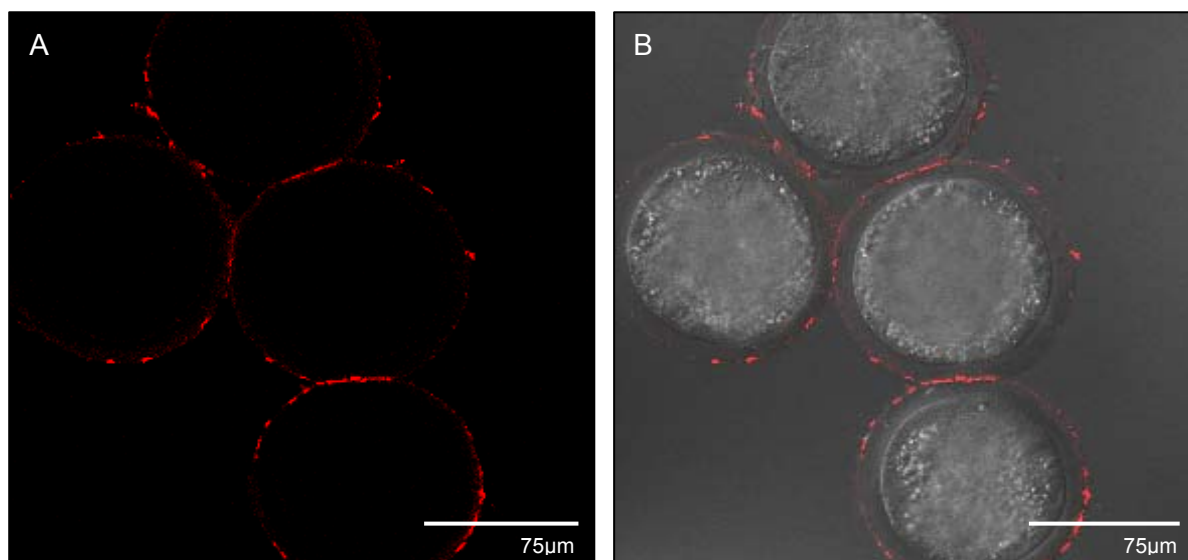
Cuando los ovocitos porcinos fecundados se procesaron con la ZP se observó marcaje anti-tPA en la ZP coincidiendo con la localización de los espermatozoides adheridos a la misma (Figura 6.17).



**Figura 6.16.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro* y posteriormente fecundados *in vitro*, marcados simultáneamente con anticuerpo anti-tPA y PNA-FITC tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a ovocitos marcados con PNA-FITC. B) Marcaje con anti-tPA y TRITC. C) Imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos. D) Resultado de la superposición de las tres imágenes anteriores.



**Figura 6.17.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro* y posteriormente fecundados *in vitro*, marcados con anticuerpo anti-tPA sin eliminar la ZP y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con anti-tPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos.

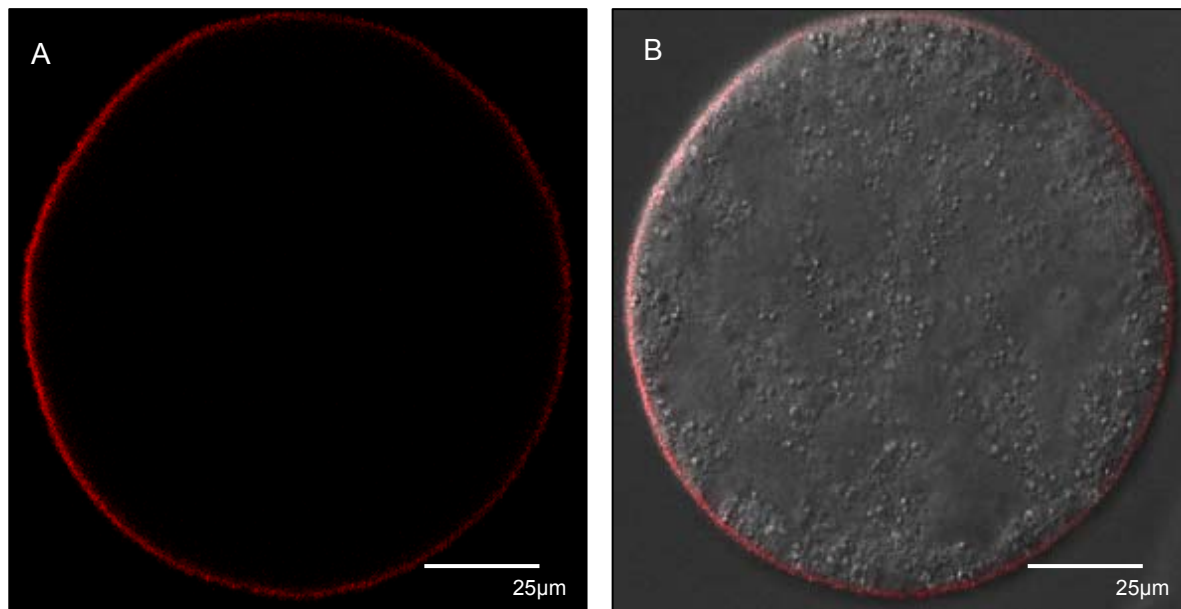


#### 6.4.3. Experimento 4.3. Inmunolocalización de uPA

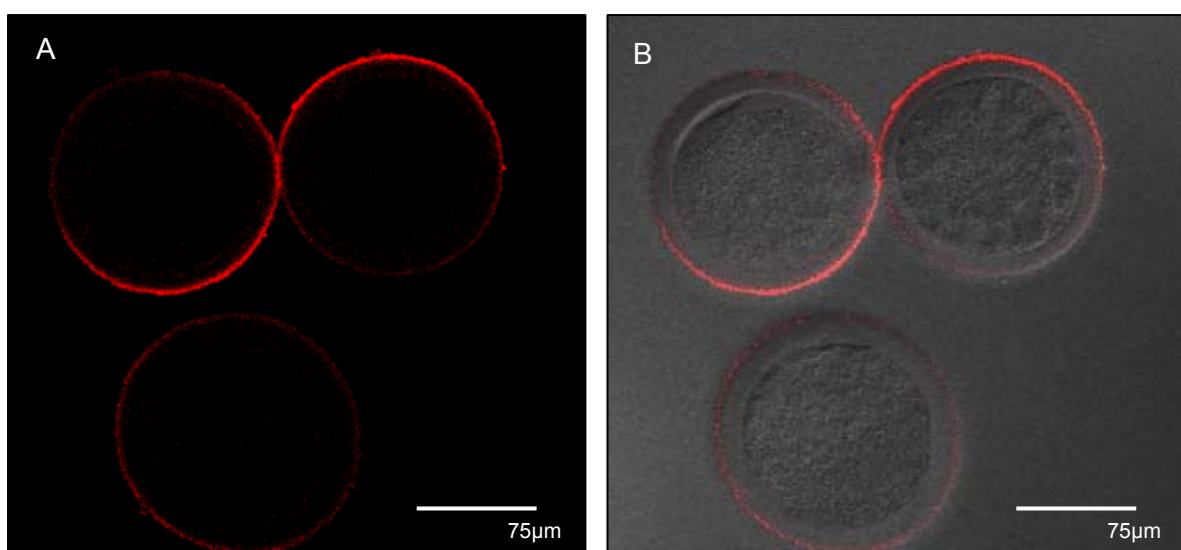
En los ovocitos bovinos madurados *in vitro* el uPA se inmunolocalizó, de modo similar a lo observado en el caso del tPA, en la región que podría corresponder a la membrana plasmática (Figura 6.18). Cuando la ZP no se eliminó, el marcaje del anticuerpo anti-uPA también se observó en la parte exterior de la misma (Figura 6.19).

Sin embargo, tras la fecundación, el marcaje con el anticuerpo anti uPA no fue visible en el oolema (Figura 6.20) aunque sí en la ZP (Figura 6.21), donde se puede observar a mayores aumentos que el marcaje quedó circunscrito a los espermatozoides adheridos a la misma (Figura 6.22).

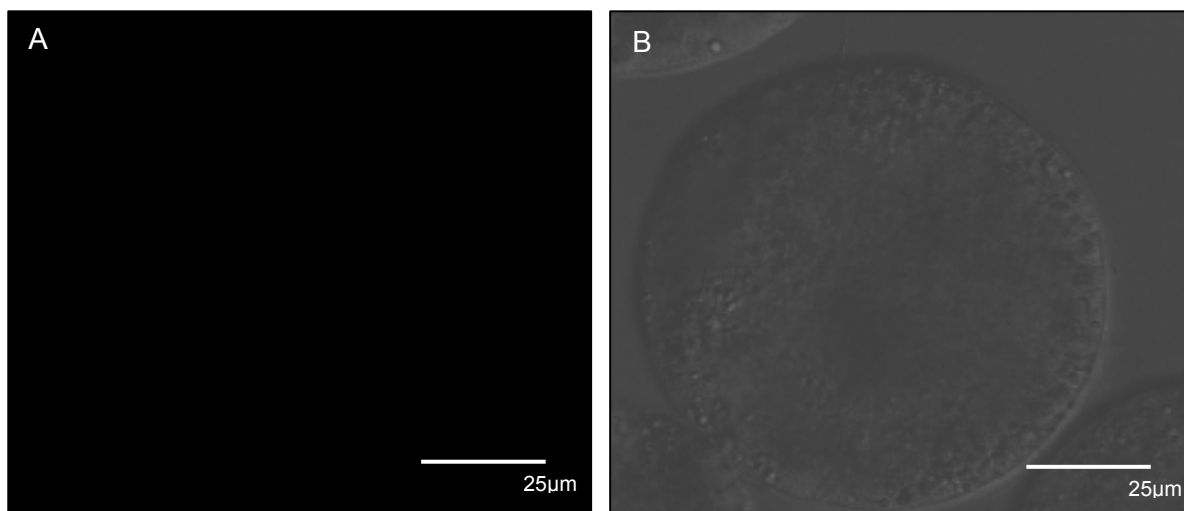
**Figura 6.18.** Ovocito bovino madurado *in vitro* marcado con anticuerpo anti-uPA tras eliminar la ZP con pronasa y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



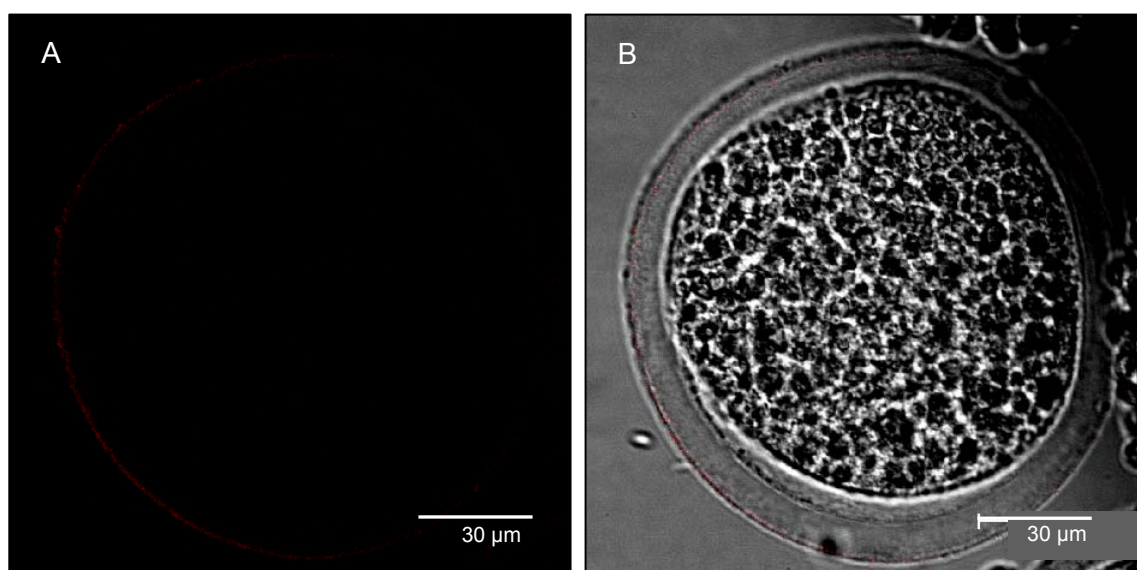
**Figura 6.19.** Ovocitos bovinos madurados *in vitro* marcados con anticuerpo anti-uPA sin eliminar la ZP y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcado con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos.



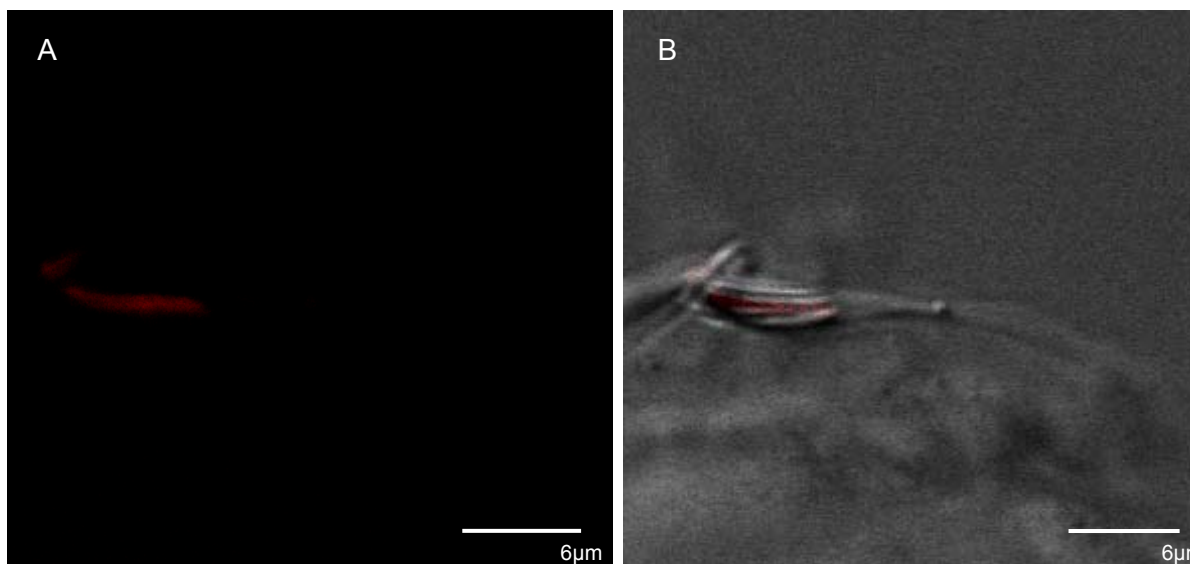
**Figura 6.20.** Ovocito bovino madurado *in vitro* y posteriormente fecundado, marcado con anticuerpo anti-uPA tras eliminar la ZP con pronasa y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



**Figura 6.21.** Ovocito bovino madurado *in vitro* y posteriormente fecundado, marcado con anticuerpo anti-uPA sin eliminar la ZP y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



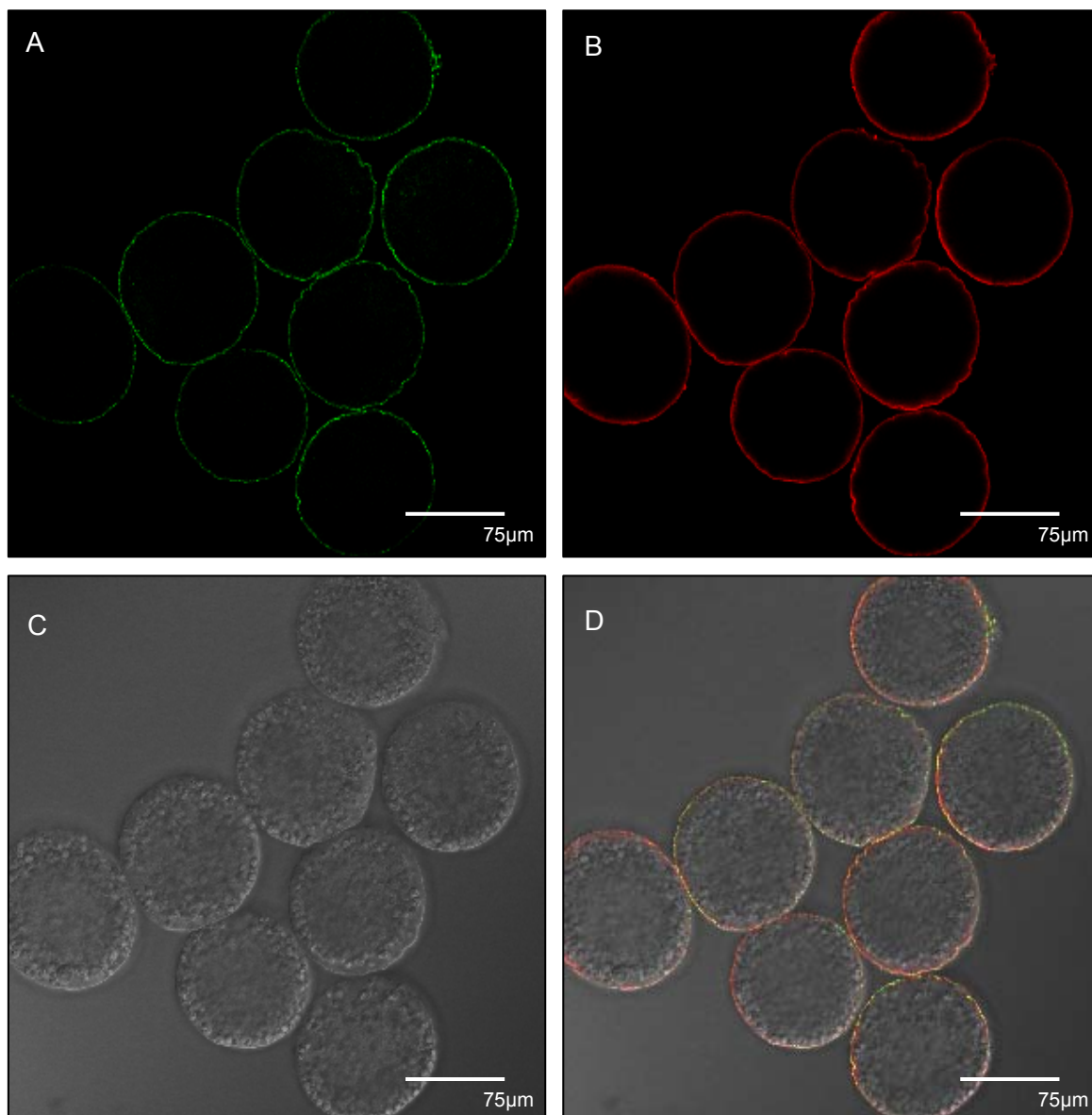
**Figura 6.22.** Detalle de un espermatozoide bovino adherido a la ZP de un ovocito madurado *in vitro* y posteriormente fecundado, marcado con anticuerpo anti-uPA y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al marcaje con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de la misma región.



En los ovocitos porcinos madurados *in vitro*, el marcaje con anticuerpo anti-uPA antes de la fecundación fue evidente en las proximidades del oolema (Figura 6.23), cercano al área marcada por PNA-FITC. También en la ZP se observó marcaje con el anticuerpo anti-uPA (Figura 6.24).

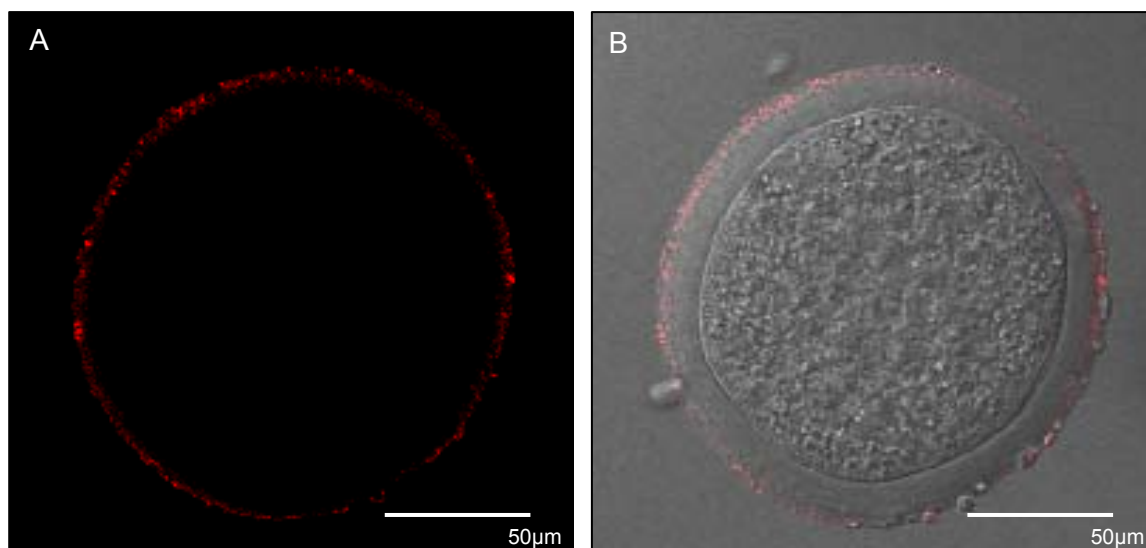
Tras la fecundación, el marcaje anti-uPA desapareció parcialmente de las proximidades del oolema (Figura 6.25) presentando una menor intensidad que en los ovocitos no fecundados (Figura 6.23). En la parte más externa de la ZP de los ovocitos fecundados se visualizó marcaje anti-uPA coincidiendo con las áreas donde se encontraban los espermatozoides adheridos (Figura 6.26).

**Figura 6.23.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro* marcados simultáneamente con anticuerpo anti-uPA y PNA-FITC tras eliminar la ZP con pronasa y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a ovocitos marcados con PNA-FITC. B) Marcaje con anti-tPA y TRITC. C) Imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos. D) Resultado de la superposición de las tres imágenes anteriores.

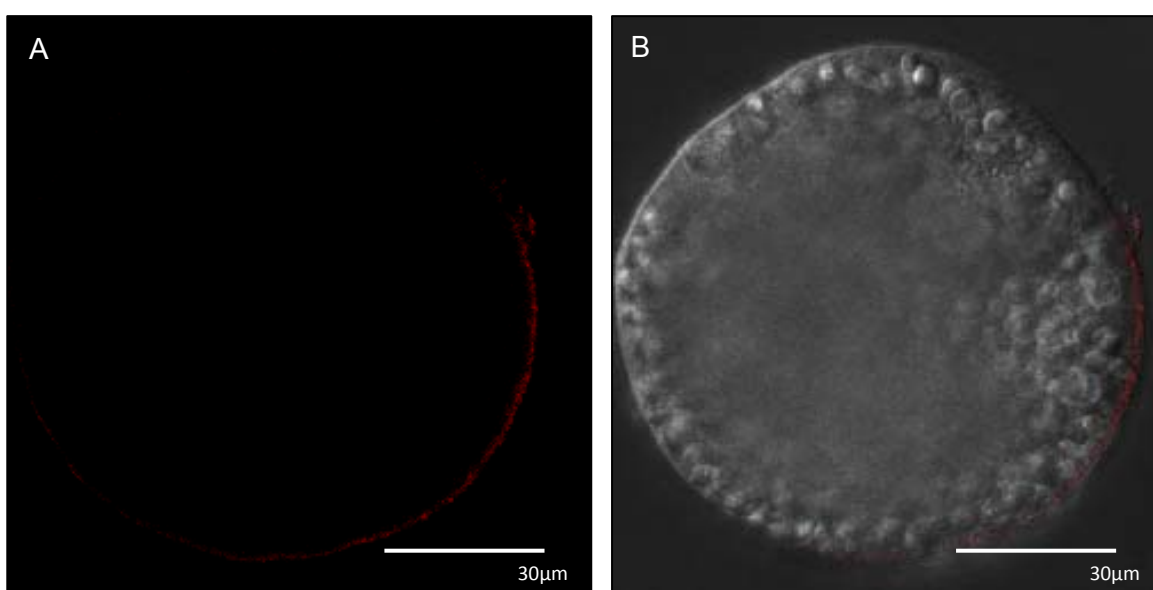




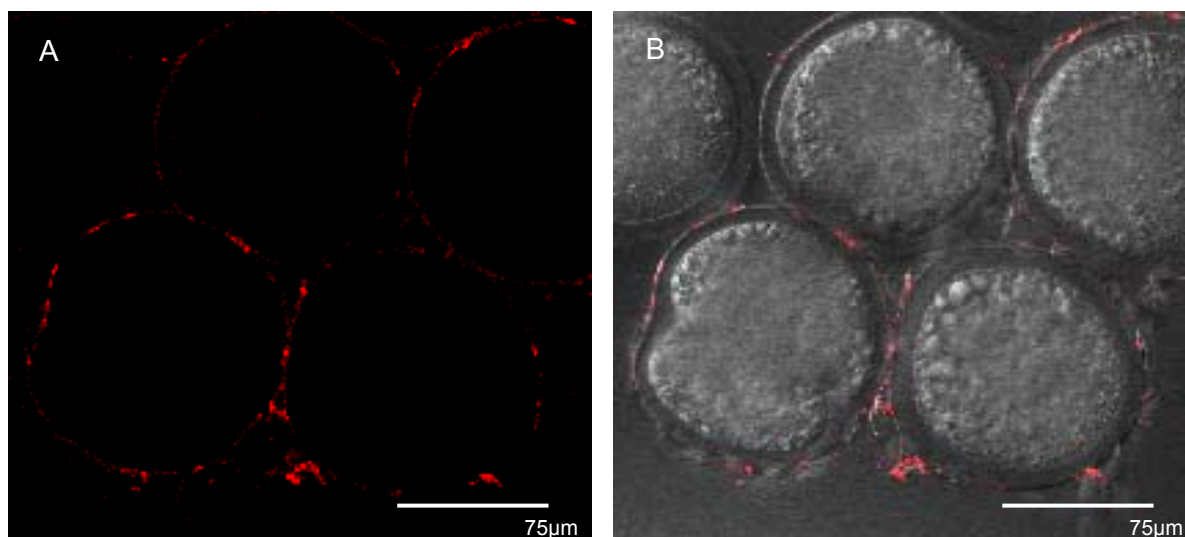
**Figura 6.24.** Ovocito porcino madurado *in vitro* marcado con anticuerpo anti-uPA sin eliminar la ZP y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



**Figura 6.25.** Ovocito porcino madurado *in vitro* y posteriormente fecundado, marcado con anticuerpo anti-uPA, tras eliminar la ZP con pronasa y observado en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente al ovocito marcado con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida del mismo ovocito.



**Figura 6.26.** Ovocitos porcinos madurados *in vitro* y posteriormente fecundados, marcados con anticuerpo anti-uPA sin eliminar la ZP y observados en microscopio confocal. A) Imagen correspondiente a los ovocitos marcados con anti-uPA y TRITC. B) Resultado de la superposición de la imagen A con la imagen de luz transmitida de los mismos ovocitos.





Para una mejor comprensión de los resultados de este apartado, se resume la información obtenida en la Tabla 6.15.

**Tabla 6.15.** Resumen de los resultados de inmunolocalización de PLG, tPA y uPA en ovocitos bovinos y porcinos antes y después de ser fecundados. -: ausencia de fluorescencia; +: fluorescencia; - (NF): se observó señal fluorescente menos intensa que en el grupo no fecundado; -/+ (esperm): la fluorescencia se observó en la ZP con espermatozoides adheridos.

|       |     |        | PLG                      | tPA                       | uPA                         |
|-------|-----|--------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| VACA  | MIV | Oolema | +<br>Fig. 6.2            | +<br>Fig. 6.10            | +<br>Fig. 6.18              |
|       |     | ZP     | +<br>Fig. 6.3            | +<br>Fig. 6.11            | +<br>Fig. 6.19              |
|       | FIV | Oolema | -<br>Fig. 6.4            | -<br>Fig. 6.12            | -<br>Fig. 6.20              |
|       |     | ZP     | - (NF)<br>Fig. 6.5       | - (NF)<br>Fig. 6.13       | - (NF)<br>Figs. 6.21 y 6.22 |
| CERDA | MIV | Oolema | +<br>Figs. 6.6 y 6.7     | +<br>Fig. 6.14            | +<br>Fig. 6.23              |
|       |     | ZP     | +<br>Fig. 6.6            | +<br>Fig. 6.15            | +<br>Fig. 6.24              |
|       | FIV | Oolema | -<br>Fig. 6.8            | - (NF)<br>Fig. 6.16       | - (NF)<br>Fig. 6.25         |
|       |     | ZP     | -/+ (esperm)<br>Fig. 6.9 | -/+ (esperm)<br>Fig. 6.17 | -/+ (esperm)<br>Fig. 6.26   |

### 6.5. Experimento 5. El PLG (1 U) no afecta a la resistencia de la ZP de ovocitos bovinos y porcinos a la digestión en pronasa

Los ovocitos bovinos madurados *in vitro* e incubados en medio de FIV con plasminógeno (1 U) durante 30 minutos no mostraron ningún incremento en la resistencia de su ZP a la digestión en pronasa (Tabla 6.16).

**Tabla 6.16.** Efecto del plasminógeno sobre la resistencia de la ZP de ovocitos bovinos a la digestión en pronasa.

| Tratamiento ovocitos | Nº ovocitos | Tiempo digestión en pronasa (s) |
|----------------------|-------------|---------------------------------|
| Control              | 70          | 124.17±5.86                     |
| PLG (1 U)            | 73          | 155.74±9.99                     |

De igual modo, los ovocitos porcinos madurados *in vitro* e incubados en medio de FIV con plasminógeno (1 U) durante 30 minutos tampoco mostraron ningún incremento en la resistencia de su ZP a la digestión en pronasa (Tabla 6.17).

**Tabla 6.17.** Efecto del plasminógeno sobre la resistencia de la ZP de ovocitos porcinos a la digestión en pronasa.

| Tratamiento ovocitos | Nº ovocitos | Tiempo digestión en pronasa (s) |
|----------------------|-------------|---------------------------------|
| Control              | 50          | 65.38±4.90                      |
| PLG (1 U)            | 49          | 54.76±3.54                      |

### 6.6. Experimento 6. La PLA (0.4 U) no afecta a la resistencia de la ZP de ovocitos porcinos a la digestión en pronasa

Al igual que había ocurrido con el PLG, la incubación con PLA durante 30 minutos de los ovocitos porcinos madurados *in vitro* no mostró ningún incremento en la resistencia de la ZP a la digestión en pronasa (Tabla 6.18).

**Tabla 6.18.** Efecto de la plasmina sobre la resistencia de la ZP de ovocitos porcinos a la digestión en pronasa.

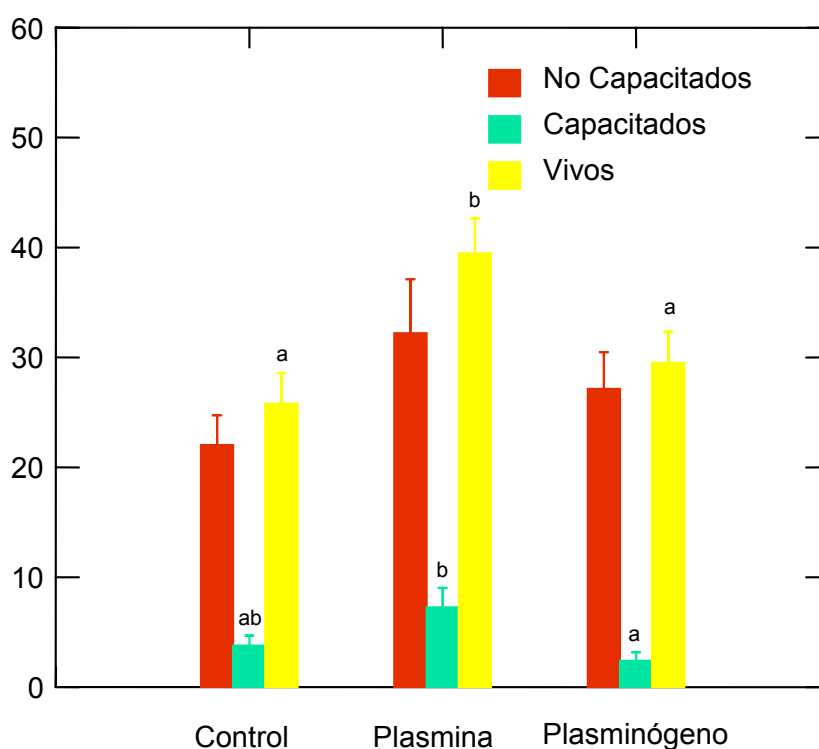
| Tratamiento ovocitos | Nº ovocitos | Tiempo digestión en pronasa (s) |
|----------------------|-------------|---------------------------------|
| Control              | 58          | 84.38±1.76                      |
| PLA (0.4)            | 60          | 76.43±5.01                      |

## 6.7. Experimento 7. El PLG (0.5 U) y la PLA (0.4 U) no disminuyen la viabilidad, capacitación y estabilidad acrosomal de los espermatozoides bovinos y porcinos

### 6.7.1. Experimento 7.1. Resultados de viabilidad y capacitación

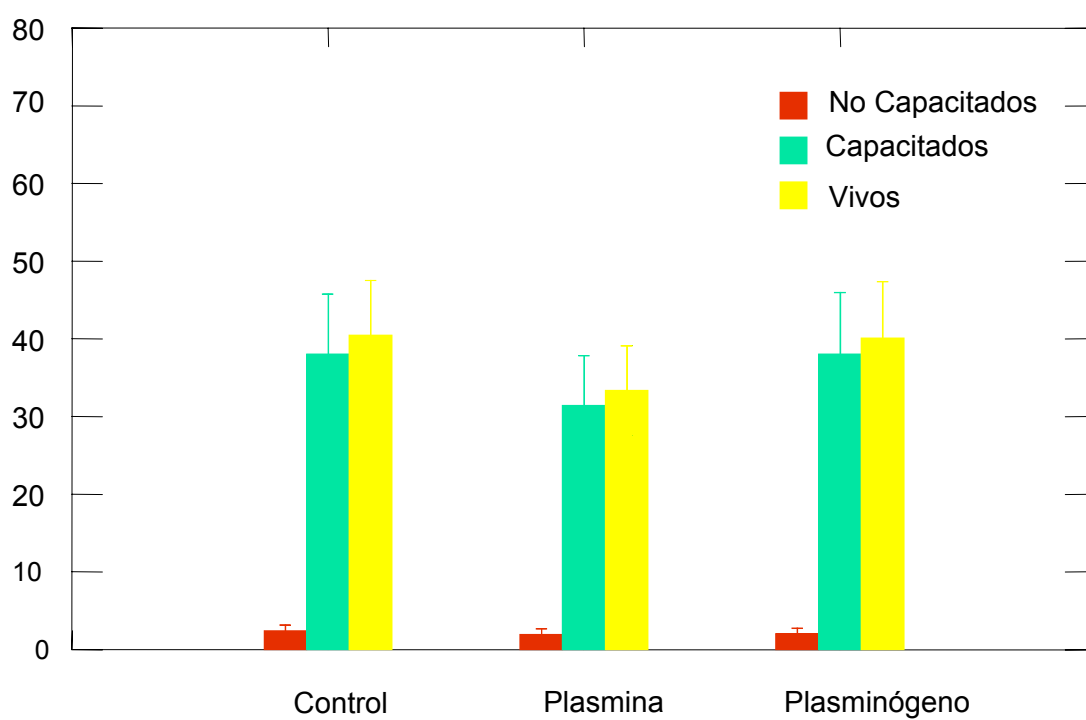
El plasminógeno, añadido a una concentración de 76.92  $\mu\text{g/ml}$  al medio de FIV, no tuvo efecto significativo sobre la viabilidad de los espermatozoides bovinos cuando éstos fueron incubados en el mismo durante 30 minutos (Figura 6.27). Tampoco el desorden lipídico de las membranas espermáticas, indicativo del estado de capacitación, se vió afectado por la presencia de plasminógeno. En cuanto a la plasmina, el porcentaje total de espermatozoides vivos ( $39.47 \pm 3.03$ ) fue superior al del grupo control ( $25.78 \pm 2.67$ ) tras 30 minutos de cultivo.

**Figura 6.27.** Efecto del plasminógeno (0.5 U) y la plasmina (0.4 U) sobre los porcentajes de viabilidad y capacitación de espermatozoides bovinos tras la incubación durante 30 minutos en medio de fecundación. <sup>a, b</sup> para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



En la especie porcina no se observó ningún efecto significativo del plasminógeno o de la plasmina sobre los parámetros estudiados (Figura 6.28).

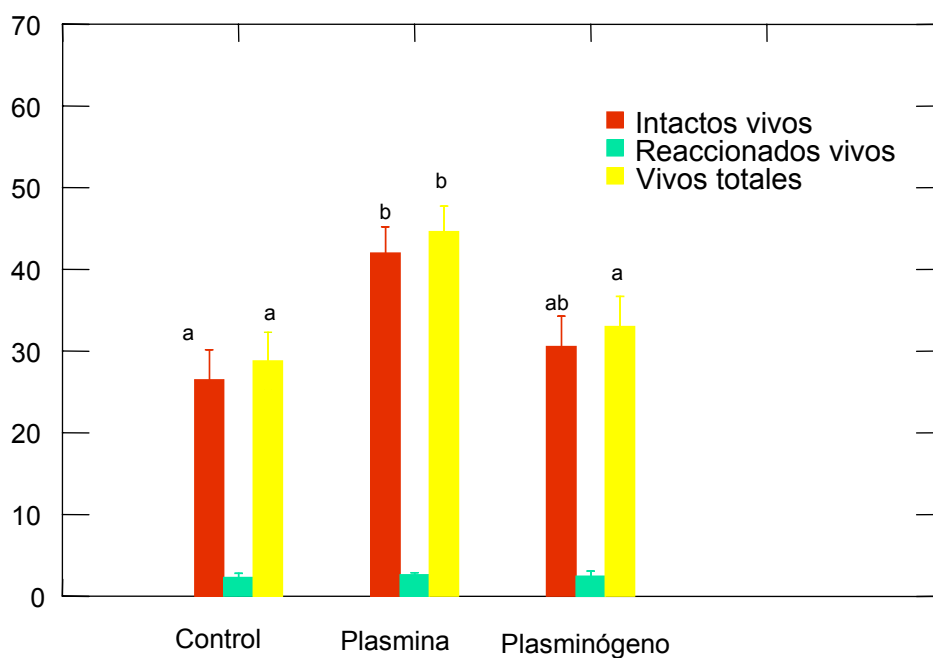
**Figura 6.28.** Efecto del plasminógeno (0.5 U) y la plasmina (0.4 U) sobre los porcentajes de viabilidad y capacitación de espermatozoides porcinos tras la incubación durante 30 minutos en medio de fecundación. <sup>a, b</sup> para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



### 6.7.2. Experimento 7.2. Resultados de viabilidad y reacción acrosómica

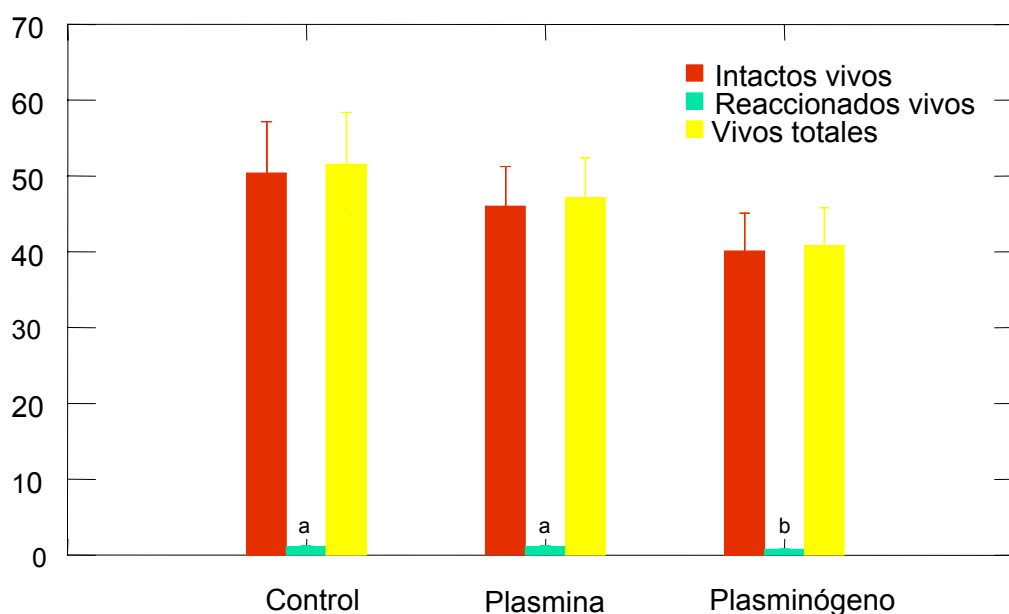
La estabilidad del acrosoma no se vió afectada por el plasminógeno (Figura 6.29). En cuanto a la plasmina, tanto el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto ( $41.98 \pm 3.08$ ) como el porcentaje total de espermatozoides vivos ( $44.63 \pm 2.99$ ) fueron superiores a los del grupo control ( $26.48 \pm 3.52$  y  $28.8 \pm 3.38$ , respectivamente).

**Figura 6.29.** Efecto del plasminógeno (0.5 U) y la plasmina (0.4 U) sobre los porcentajes de viabilidad y reacción acrosómica espontánea de espermatozoides bovinos tras la incubación durante 30 minutos en medio de fecundación. <sup>a, b</sup> para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



En la especie porcina, el plasminógeno afectó significativamente al porcentaje de espermatozoides que experimentaron la reacción acrosómica espontánea ( $0.73 \pm 0.06$ ) frente a los del grupo control ( $1.14 \pm 0.09$ ), aunque no a la proporción de espermatozoides intactos vivos ni de vivos totales. (Figura 6.30). La plasmina no afectó a ninguno de los parámetros estudiados.

**Figura 6.30.** Efecto del plasminógeno (0.5 U) y la plasmina (0.4 U) sobre los porcentajes de viabilidad y reacción acrosómica espontánea de espermatozoides porcinos tras la incubación durante 30 minutos en medio de fecundación. <sup>a, b</sup> para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



### 6.8. Experimento 8. La PLA (0.4 U) desestabiliza la unión espermatozoide-ZP en las especies bovina y porcina

En la especie bovina, la presencia de plasmina en el medio disminuyó el número de espermatozoides que permanecían adheridos a la ZP a las 3 horas del inicio del cocultivo en comparación con los que se habían adherido a los 15 minutos (Tabla 6.17). En el grupo control, sin embargo, el número de espermatozoides adheridos a los 15 minutos no fue diferente del número adherido a las 3 horas. A las 24 horas, los espermatozoides que permanecían adheridos en el grupo control fueron iguales a los observados a las 3 horas en este mismo grupo y lo mismo ocurrió con el grupo de ZPs tratadas con plasmina.

**Tabla 6.17.** Número medio de espermatozoides unidos a ZPs bovinas en medio de FIV con o sin plasmina (0.4 U) tras diferentes tiempos de cocultivo. Se indica la media  $\pm$  sem de 120 zonas pelúcidas por grupo y el número máximo y mínimo de espermatozoides por zona pelúcida observados para cada grupo.

| Grupo                                 | Control<br>15 min            | Control<br>3 horas            | Plasmina<br>3 horas          | Control<br>24 horas          | Plasmina<br>24 horas         |
|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Espermatozoides /ZP (media $\pm$ sem) | 3.97 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup> | 3.29 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup> | 1.89 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup> | 2.81 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup> | 1.19 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup> |
| Espermatozoides /ZP (máximo-mínimo)   | 1-9                          | 1-9                           | 1-4                          | 1-6                          | 0-3                          |

<sup>a, b, c</sup> para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).



En la especie porcina, los resultados fueron similares a los observados en la especie bovina, aunque en este caso la reducción en el número medio de espermatozoides adheridos a la ZP en el grupo tratado con plasmina se observó no sólo a las 3 horas sino también a las 24 horas del inicio del cultivo (Tabla 6.18).

**Tabla 6.18.** Número medio de espermatozoides unidos a ZP porcinas en medio de FIV con o sin plasmina (0.4 U) tras diferentes tiempos de cocultivo. Se indica la media  $\pm$  sem de 120 zonas pelúcidas por grupo y el número máximo y mínimo de espermatozoides por zona pelúcida observados para cada grupo.

| Grupo                                       | Control<br>15 min             | Control<br>3 horas            | Plasmina<br>3 horas           | Control<br>24 horas           | Plasmina<br>24 horas          |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Espermatozoides<br>/ZP (media $\pm$<br>sem) | 91.19 $\pm$ 2.29 <sup>a</sup> | 88.32 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup> | 26.46 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup> | 84.09 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup> | 16.54 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup> |
| Espermatozoides<br>/ZP (máximo-<br>mínimo)  | 30-135                        | 39-135                        | 5-55                          | 39-120                        | 2-40                          |

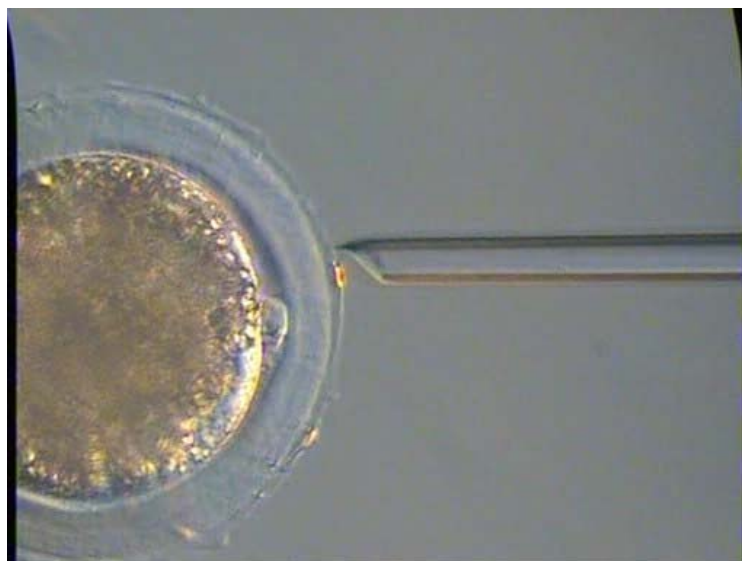
<sup>a, b, c</sup> para el mismo parámetro indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

### 6.9. Experimento 9. La adición de PLA sobre ovocitos fecundados permite visualizar en tiempo real la desestabilización de la unión espermatozoide-ZP

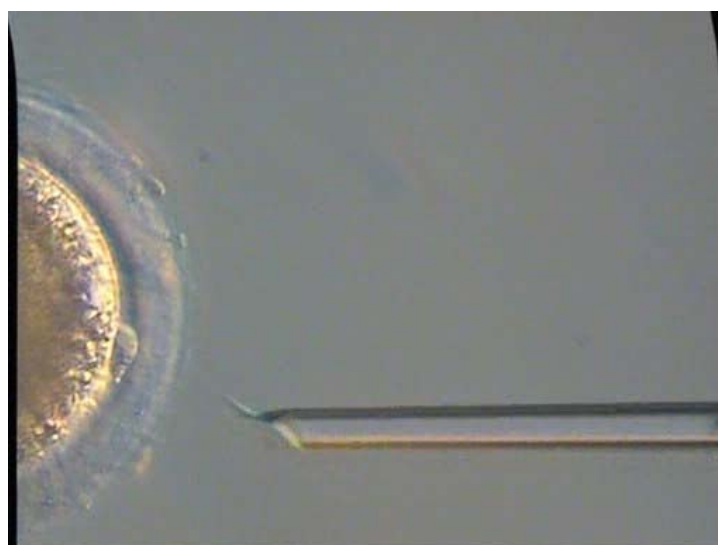
Los videos obtenidos demostraron que tras 2 horas de contacto, la unión de los espermatozoides a la ZP porcina era lo suficientemente firme como para que los intentos de romperla con la pipeta de microinyección resultaran infructuosos (Figura-Video 6.31). Sin embargo, cuando se aplicaban  $2 \times 10^{-5}$   $\mu$ l de la solución de PLA (0.4 U) en las cercanías del dicha unión, ésta se tornaba mucho más lábil, y con apenas un leve contacto de la pipeta, los espermatozoides se desprendían fácilmente (Figura-Video 6.32).

En los 10 videos realizados sobre ovocitos distintos el efecto observado fue el mismo en el 100% de los casos: la adición de PLA rompía la unión de los espermatozoides a la ZP.

**Figura 6.31.** Videoclip mostrando un ovocito porcino madurado y fecundado *in vitro* en el que se intenta despegar sin éxito uno de los espermatozoides adheridos a la ZP empleando una micropipeta de inyección.



**Figura 6.32.** Videoclip mostrando el mismo ovocito porcino madurado y fecundado *in vitro* de la Figura 6.29 en el que se consigue despegar el mismo espermatozoide del videoclip anterior empleando una micropipeta de inyección tras haber liberado  $2 \times 10^{-4}$   $\mu\text{l}$  de una solución de plasmina en las proximidades de la unión espermatozoide-ZP.



# Discusión

## Discusión

## 7. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo confirman la hipótesis de partida, ya que demuestran que el sistema plasminógeno-plasmina está implicado en el proceso de fecundación. El plasminógeno está presente en la ZP y en las cercanías de la membrana plasmática de los ovocitos bovinos y porcinos, como había sido descrito en el hámster (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002), y los activadores tPA y uPA se localizan también en ambas micro-regiones antes de la fecundación. Con la llegada del espermatozoide a la ZP y al oolema, la señal indicativa de la presencia de dichos activadores disminuye lo cual indica que su actividad favorecedora de la conversión del plasminógeno en plasmina en ambas localizaciones aumenta. La presencia de plasmina en la ZP provoca una rotura de las uniones espermatozoide-ZP y por lo tanto regula la penetración de gametos masculinos adicionales al interior del ovocito. Sin embargo, el tratamiento con plasminógeno o plasmina no afecta a la resistencia de la ZP a la digestión con pronasa, por lo que el sistema no está implicado en el proceso de endurecimiento post-fecundación de la misma, y tampoco afecta negativamente a la viabilidad de los espermatozoides ni a los procesos de capacitación y reacción acrosómica, por lo que la disminución en la unión y penetración al ovocito no puede ser achacada a fallos en la funcionalidad espermática.

Para una mejor discusión de los resultados, este apartado se dividirá en tres subsecciones, correspondientes a cada uno de los tres objetivos planteados al inicio de este estudio.

### 7.1. Papel del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación bovina y porcina.

Los resultados de los ensayos de fecundación *in vitro* realizados en las dos especies estudiadas (bovina y porcina) demuestran que la adición de PLG y/o PLA al medio de coincubación, a una concentración desde próxima hasta 3 veces menor a la detectada en plasma humano, afecta significativamente a los parámetros relacionados con la unión y penetración de los espermatozoides en el ovocito.

En el experimento 1 se utilizó un PLG comercial de Sigma extraído de plasma bovino a una concentración próxima a la detectada en plasma humano.

Este PLG provocó una marcada disminución en los porcentajes de penetración, que llegaron a ser un 70% (especie bovina) o un 50% (especie porcina) inferiores a los del

grupo control cuando la adición se realizó media hora después de la introducción de los espermatozoides en el pocillo de fecundación donde se encontraban los ovocitos. Como consecuencia de esta disminución de la penetración, los porcentajes de monospermia experimentaron un incremento proporcional, tanto mayor cuanto más tarde se adicionó el PLG al medio. Del mismo modo, se observó que el número medio de espermatozoides que habían conseguido penetrar en el ovocito a las 18-20 horas post-inseminación, y el número medio de espermatozoides que permanecían unidos a la ZP, disminuía progresivamente en función del momento de adición del PLG. Lógicamente, esta disminución fue mucho más marcada en la especie porcina, donde el número medio de espermatozoides que penetra en los ovocitos o que se unen a la ZP suele estar muy por encima del referido para la especie bovina (Coy *et al.*, 2008b).

La primera deducción que se obtiene de estos datos nos lleva a pensar que el PLG presente en el fluido oviductal, y ausente en los medios de fecundación, pueda tener un papel regulador en el control de la polispermia, o al menos en la regulación de la penetración espermática en los ovocitos, que hasta ahora no había sido tenido en cuenta en los sistemas de FIV en estas especies. Aunque, hasta donde llega nuestro conocimiento, no se han encontrado referencias en la bibliografía sobre la presencia de PLG en fluido oviductal y, por lo tanto, se desconoce a qué concentración estaría esta glicoproteína en el mismo, es evidente que debe estar presente, ya que existen numerosos estudios que han identificado a distintos componentes del sistema PLG-PLA en el oviducto. Así, Huarte *et al.*, en 1993 (Huarte *et al.*, 1993), indicaron que la concentración de PLG en complejos *cumulus*-ovocitos obtenidos mediante disección de la ampolla oviductal de ratonas fue de 200 ng/ml y supusieron que la mayoría de este PLG debía ser de origen oviductal. Tanto el ARNm de uPA como la actividad enzimática de uPA y PAI-1 han sido detectados en células oviductales bovinas (Gabler *et al.*, 2001), siendo los niveles de expresión del ARNm para uPA tres veces mayores antes de la ovulación que después de ésta. Además, el PAI-1 es secretado por las células oviductales, sobre todo a nivel del istmo en la especie porcina, y su síntesis es inhibida por los estrógenos (Kouba *et al.*, 2000a; Kouba *et al.*, 2000b; Tsantarliotou *et al.*, 2005), lo que corrobora la posibilidad de que exista actividad PLA en la ampolla oviductal durante la fecundación, generada por los altos niveles de estrógenos. Por último, en las células oviductales de hámster se ha comprobado que existe actividad de los activadores del plasminógeno, siendo tPA responsable del 90% de dicha actividad y uPA responsable del 10% restante (Jimenez Diaz *et al.*, 2000).

Por lo tanto, volviendo a los resultados de nuestro estudio, con la idea en mente de que el PLG está presente en el fluido oviductal durante la fecundación natural, correspondería interpretar la función de esta glicoproteína durante la interacción de los gametos empleando para ello los ensayos de laboratorio que más nos puedan aproximar a la realidad fisiológica, que en este caso corresponden a los obtenidos mediante la técnica de fecundación *in vitro*. Estudios anteriores al nuestro han sugerido que el PLG añadido al medio de FIV puede tener tanto un efecto estimulador como inhibidor de la unión espermatozoide-ZP y de la penetración.

Así, Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993) observaron un incremento en los porcentajes de fecundación de ovocitos de ratón y en el número de espermatozoides unidos a la ZP cuando añadieron PLG al medio de FIV, indicando que también aumentó la actividad PLA. Las concentraciones que emplearon variaron de 3 a 100  $\mu\text{g/ml}$ , pero el incremento en los porcentajes de fecundación sólo se observó hasta la concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ , manteniéndose inalterable a partir de la misma. Estos autores demostraron que ambos gametos y las células del *cumulus* son capaces de unir moléculas de PLG a su superficie celular porque poseen sitios de unión para el mismo. Empleando PLG marcado con  $\text{I}^{125}$  demostraron también que las moléculas de PLG compiten entre sí por los sitios de unión en los gametos. En el presente estudio, como hemos comentado, incluso a la concentración de PLG más parecida a la empleada por Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993), que en nuestro caso fue de 38.46  $\mu\text{g/ml}$  en el experimento 2, el efecto observado fue contrario al descrito por estos autores, ya que obtuvimos una disminución en los porcentajes de penetración tanto en la especie bovina, en la que bajaron del  $93.59 \pm 1.97\%$  del grupo control al  $60.39 \pm 3.95\%$  en el grupo tratado con PLG, como en la especie porcina, en la que frente al  $94.70 \pm 1.96\%$  de penetración en el grupo control se obtuvo un  $85.50 \pm 3.1\%$  en el grupo tratado con PLG.

Otros autores con resultados diferentes a los nuestros fueron Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2009), los cuales, utilizando una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de PLG en el medio de fecundación en la especie porcina, observaron un aumento en el número de espermatozoides unidos a la ZP y en el porcentaje de formación de pronúcleos masculinos en comparación con un grupo control, sin encontrar diferencias en cuanto a porcentajes de fecundación o monospermia. Estos resultados, sin embargo, no son comparables a los obtenidos en el presente estudio porque el medio de fecundación empleado por estos autores, el TBM, no permitió la formación del pronúcleo masculino en los ovocitos del grupo control en niveles similares a los que obtuvimos nosotros empleando el medio TALP para la FIV (51.4% para el caso de Kim *et al.* frente al 96-100%

del presente trabajo). Esto indica que las condiciones de FIV elegidas por estos autores de algún modo dificultaron la activación completa del ovocito tras la penetración y por tanto la formación de pronúcleos masculinos. Por otro lado, resulta llamativo el hecho de que, mientras que en nuestro caso observamos una disminución en los porcentajes de formación de pronúcleo masculino (aunque sólo en la especie bovina y sólo cuando el PLG se añadió en el momento de la FIV ó 30 minutos más tarde), Kim *et al.* refieren un aumento en este porcentaje desde el 51.4% ya comentado para el grupo control al 74.5% cuando adicionaron 50 µg/ml de PLG al medio de fecundación. Sería interesante diseñar algún experimento en el futuro que permitiera explicar las razones de esta discrepancia, aunque insistimos en el hecho de que el grupo control del estudio de Kim *et al.* distó mucho de ofrecer las mejores condiciones para la FIV porcina.

En la especie bovina, tampoco los resultados de experimentos similares a los nuestros coinciden con los obtenidos, ya que Papanikolaou *et al.* (Papanikolaou *et al.*, 2008) no observaron ningún cambio en los resultados de FIV cuando añadieron PLG al medio, en este caso en dosis 50 veces superiores a la empleada por nosotros. La explicación para tales diferencias podríamos encontrarla en la alta dosis de PLG empleada por estos autores, que podría haber provocado en el ovocito un aumento en la secreción de PAI (Canipari *et al.*, 1995) anulando la activación de PLG añadido y la consecuente generación de PLA en el medio, al margen de que esta dosis se halle fuera del rango que podríamos considerar fisiológico.

El caso contrario se refiere en los trabajos de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1992). Estos autores observaron que los ovocitos de rata liberaban al medio una sustancia de 70-72 kDa cuando eran activados por el espermatozoide o por ionóforo de calcio y que dicha sustancia en presencia de PLG era capaz de lisar la fibrina, por lo que concluyeron que se trataba de tPA. Además, si se neutralizaba la actividad de dicha sustancia con un anticuerpo anti-tPA específico que bloqueara su capacidad proteolítica, se observaba un incremento en la penetración de los ovocitos empleados en FIV con respecto a los ovocitos no tratados con el anticuerpo. Debido a que en otro experimento, estos mismos autores, observaron que en ovocitos de rata activados con ionóforo de calcio la resistencia de la ZP a la digestión con quimotripsina disminuía significativamente (desde 10-12 minutos hasta 1 minuto) si se empleaba este mismo anticuerpo anti-tPA, concluyeron que el tPA tenía un papel en el control de la polispermia, y que era liberado tras la activación de los ovocitos probablemente desde los GC, provocando el “endurecimiento” post-fecundación de la ZP.

Por lo tanto, la conclusión de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1992), en coherencia con nuestros datos, fue que el sistema PLG-PLA interviene en la regulación de la penetración disminuyendo la misma, probablemente participando en el “endurecimiento” de la ZP post-fecundación y posiblemente también mediante una liberación de tPA desde los GCs que provocaría la activación del PLG y la proteólisis de la ZP por acción de la PLA, impidiendo de este modo la entrada de espermatozoides adicionales al ovocito.

Si bien la primera de las suposiciones (el sistema PLG/PL participa en el “endurecimiento” post-fecundación de la ZP) no ha sido corroborada fehacientemente en trabajos posteriores como comentaremos en otro apartado de esta discusión, sí lo fue la segunda (tPA está presente en extractos de GCs). Así, Rekkas *et al.* (Rekkas *et al.*, 2002) demostraron la presencia de tPA en extractos de GCs de ovocitos bovinos, y que dicha presencia aumentaba al ir aumentando el número de horas de maduración de los mismos desde 0 h hasta las 24 h usualmente empleadas en la MIV. En nuestra opinión, el hecho de que detectaran tPA aspirando con una aguja de microinyección el contenido del ovocito en la región cortical no implica necesariamente que dicho tPA estuviera en el interior de los GCs, como posteriormente razonaron Hoodbhoy y Talbot (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Sin embargo, coincidimos con estos últimos autores en que tPA podría ser secretado por los ovocitos no fecundados, de modo independiente a la exocitosis de los GC, tal y como ha sido descrito para calreticulina en ovocitos de ratón (Tutuncu *et al.*, 2004). Por lo tanto, en este sentido, la posibilidad de que el sistema PLG-PLA participe en la regulación de la polispermia, activándose como consecuencia del contacto del ovocito con el espermatozoide, sigue abierta.

Como puede deducirse de los párrafos anteriores, los resultados sobre el efecto de los diferentes componentes del sistema PLG-PLA en la FIV no están del todo aclarados, aunque es evidente que su presencia afecta a este proceso. En nuestro caso, la adición de PLG al medio de FIV disminuyó, de un modo concentración- y tiempo-dependiente, como hemos visto en los experimentos 1 y 2, la entrada de espermatozoides al ovocito y la unión de los mismos a la ZP, lo que coincidiría con las propuestas de Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1992). Sin embargo, dadas las discrepancias en la bibliografía, nos quedaron muchas dudas por aclarar tras la realización de estos experimentos. Así, quisimos comprobar que el efecto observado correspondía al que tendría lugar si añadiéramos PLA activa directamente, sin necesidad de que el PLG se activara por la posible presencia de tPA o uPA en los gametos. En el experimento 3, en el que añadimos PLA, pudimos comprobar que los resultados eran semejantes a los obtenidos tras la adición de PLG, salvando las diferencias debidas a la imposibilidad de ajustar



exactamente las dosis de los dos compuestos comerciales, PLG y PLA, que resultaran en el mismo nivel de actividad proteolítica (en el primer caso tras la activación, y en el segundo directamente). Tanto en la especie bovina como en la porcina, la penetración espermática disminuyó significativamente cuando se adicionó PLA al medio de FIV, y además en la especie porcina se observó un marcado incremento de la monospermia y una disminución del número de espermatozoides unidos a la ZP. Por tanto, concluimos que el efecto observado en los experimentos 1 y 2 era debido a la actividad PLA generada en nuestro sistema de FIV, y no a cualquier otra acción del PLG inactivo como un posible impedimento estérico de la unión espermatozoide-ZP.

Estos resultados nos convencieron de que, efectivamente, tanto el PLG como la PLA no favorecen la penetración sino que la regulan a la baja. No obstante, en el experimento 1, como ya se ha explicado, el efecto del PLG fue más marcado cuanto más tarde se añadió al medio de fecundación y esta diferencia merece ser analizada. El PLG añadido 30 minutos antes de añadir los espermatozoides disminuyó la penetración un 30% y la unión espermatozoide-ZP un 52% aproximadamente en la especie porcina, mientras que el añadido 30 minutos después provocó una disminución del 50% y el 87% en los mismos parámetros, respectivamente. El grupo de PLG añadido en el momento de la inseminación presentó valores intermedios entre ambos.

Los activadores responsables de la generación de PLA en este experimento debían proceder necesariamente de los gametos, como hemos comentado, ya que no se añadió fluido oviductal. De hecho, ya Cannon y Menino (Cannon y Menino, 1998) sugirieron que los espermatozoides podrían activar el PLG de origen oviductal presente en la superficie celular mediante el uPA anclado a su receptor, dirigiendo en consecuencia la proteólisis localizada, y mediada por PLA, de la ZP durante la penetración. Por lo tanto, si aceptamos que el efecto observado en nuestros 3 grupos experimentales es consecuencia de la activación del PLG a PLA por los activadores (tPA, uPA o ambos) liberados por los gametos, el hecho de que los 3 grupos se comportaran de modo semejante indicaría que a igual concentración de PLG en el medio, e igual número de ovocitos y espermatozoides, la capacidad de activación de PLG en nuestro sistema es la misma. Es decir, el número de sitios de unión para PLG en los gametos sería el mismo, y por tanto la cantidad final de PLA producida en las proximidades de la ZP también sería equivalente. Como la evaluación se realiza a las 20 horas de la FIV, para ese momento, todo el PLG que hubiera podido ser activado a PLA sería igual en los 3 grupos experimentales, aunque en las primeras horas hubiera podido haber diferencias por haber añadido antes o después el PLG. Sin embargo, como hemos visto, esto no fue así y por lo tanto tuvimos que buscar

argumentos que pudieran explicar el comportamiento dispar de los parámetros analizados entre los 3 grupos experimentales.

Como indicaron Miles y Plow (Miles y Plow, 1985), la unión de PLG a la superficie de las células, en su caso plaquetas, estimula su conversión en PLA, probablemente porque favorece la proximidad entre el PLG y sus activadores (Huarte *et al.*, 1993). Miles y Plow demostraron también que la unión de PLG a las plaquetas fue aumentando con el tiempo y que cuando se añadieron activadores (tPA y uPA), se detectó PLA preferentemente asociada a las plaquetas, y no al sobrenadante del medio.

También Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993) indicaron que la generación de PLA y su actividad por interacción con los sitios de unión da lugar a una proteólisis catalizada por los activadores restringida a sitios concretos del ambiente pericelular más que expresada indiscriminadamente en el espacio extracelular (Huarte *et al.*, 1993). De hecho, es bien conocido en el mecanismo de fibrinólisis fisiológica que el tPA tiene una baja afinidad por el PLG libre en el plasma, aunque presenta una alta afinidad por el PLG unido a fibrina.

Esto podría explicar las diferencias que encontramos entre nuestros grupos experimentales. Cuando añadimos PLG al medio de cultivo en presencia únicamente de ovocitos (30 minutos antes de la inseminación), el número de sitios de unión para el mismo fue obviamente menor que cuando se añadió en presencia de ovocitos y espermatozoides (en el momento de la inseminación o 30 minutos después). El PLG libre, no unido a la matriz extracelular (ZP en nuestro caso) o a la superficie celular en un medio acuoso, diluido por encima de su concentración de almacenamiento, precipita (comunicación personal, David S. Ginsberg, Vicepresidente de Operaciones de *Molecular Innovations Inc.* y observaciones propias) y en consecuencia ya no puede ser activado a PLA ni ejercer ningún efecto. Esto podría explicar las diferencias encontradas entre el primer grupo experimental de nuestro estudio (PLG añadido 30 minutos antes de la FIV) y los otros dos (PLG añadido en el momento de la FIV o 30 minutos después).

Apoyando esta explicación, y ayudándonos a interpretar las diferencias encontradas entre los dos grupos que ya contaban con los ovocitos y espermatozoides en el medio de cultivo cuando se añadió el PLG (PLG añadido en el momento de la FIV ó PLG añadido 30 minutos después), encontramos el planteamiento de Jiménez Díaz *et al.* (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002). Estos autores sugirieron que la presencia de activadores oviductales (o, en nuestro caso, liberados por los gametos tras la inseminación) activa los sitios específicos de unión del PLG presentes en la membrana del ovocito, permitiendo que el PLG unido a

la ZP pueda traslocarse hacia el oolema. Recientemente, Andronicos *et al.* (Andronicos *et al.*, 2009) han descubierto un nuevo receptor para el PLG (PLG-RKT) en células sanguíneas que expone las lisinas C-terminales sobre la superficie celular y que colocaliza ampliamente con el receptor del uPA. Los datos de estos autores sugieren que el PLG-RKT también puede interactuar directamente con uPA y que promueve la activación del PLG de la superficie celular. Como está demostrada la presencia de uPA en la membrana plasmática de los espermatozoides (Huarte *et al.*, 1987a) y su secreción por parte de las células del *cumulus* (D'Alessandris *et al.*, 2001), sería probable que la activación del PLG de la ZP por uPA y su posterior liberación de los sitios de unión en forma de PLA, dejando nuevos sitios libres para unir más PLG, se viera aumentada a los 30 minutos de la interacción espermatozoide-ovocito, explicando las diferencias encontradas en nuestros grupos experimentales.

Es decir, en nuestras condiciones, la adición de PLG al medio de FIV cuando ya hubieran empezado a liberarse sitios de unión en la ZP de los ovocitos (grupo PLG añadido 30 minutos después de la FIV) bien por traslocación hacia la membrana (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002) o bien por liberación del PLG en forma de PLA por la acción de los espermatozoides sobre la ZP (Andronicos *et al.*, 2009), sería más efectiva que 30 minutos antes (grupo PLG añadido en el momento de la FIV), cuando el número de sitios de unión sería menor y parte del PLG precipitaría en el medio. Los experimentos de Jiménez Díaz *et al.* (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002) fueron realizados en el hámster, y hasta donde hemos podido averiguar, la teoría de la traslocación del PLG desde la ZP a la membrana plasmática del ovocito no se ha confirmado en otras especies, entre otras razones porque no se han hecho estudios concretos de inmunolocalización del PLG en ovocitos porcinos o bovinos antes y después de la fecundación. Además, se desconoce si el receptor descrito por Andronicos *et al.*, (Andronicos *et al.*, 2009) está presente en los ovocitos y tampoco existen estudios claros que demuestren la localización precisa de tPA y uPA en los mismos. Por este motivo, y para conseguir el segundo de los objetivos planteados en nuestro estudio, se procedió a realizar el experimento 4.

## 7.2. Inmunolocalización del plasminógeno y sus activadores en ovocitos madurados *in vitro* bovinos y porcinos antes y después de ser fecundados

### 7.2.1. Inmunolocalización de plasminógeno

Como se ha comentado en la revisión bibliográfica del presente estudio, el PLG se sintetiza principalmente en el hígado y está presente en el plasma y en la mayoría de los fluidos extracelulares. Entre estos fluidos, ha sido demostrada en diversas ocasiones la presencia de PLG en el fluido uterino (Fazleabas *et al.*, 1983; Finlay *et al.*, 1983), al igual que en el fluido folicular del ovario (Beers, 1975) o en el fluido peritoneal (Padilla *et al.*, 1986). Sin embargo, con la excepción de los trabajos ya comentados de Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1993) en el ratón, indicando que los gametos son capaces de unir moléculas de PLG, y los de Jiménez Díaz *et al.* (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002) en el hámster, detectando la presencia de PLG en ZP y membrana de ovocitos por técnicas de inmunofluorescencia indirecta, no hemos encontrado otras referencias en la bibliografía sobre la presencia de PLG en ovocitos.

A pesar de ello, es evidente que la molécula de PLG, por sus características y ubicuidad, tiene muchas posibilidades de estar presente en los ovocitos. Ya hemos indicado anteriormente que el PLG presenta en su cadena  $\alpha$  un dominio de unión a lisinas que media su interacción con proteínas que presentan lisinas C-terminales y que esto explica su baja especificidad de unión (Redlitz y Plow, 1995). Los receptores de PLG han sido detectados prácticamente en todos los tipos celulares testados y entre sus características destacan, además de su relativamente baja afinidad, su extraordinariamente alta densidad en muchas células (Redlitz y Plow, 1995).

Por otra parte, también se ha demostrado ampliamente que el PLG se puede unir a la matriz extracelular de manera específica, saturable y reversible (Knudsen *et al.*, 1986), y que de este modo se facilita la generación de PLA, que se desprende de los sitios de unión y degrada dicha matriz. La ZP constituye por sí misma una parte importante de la matriz extracelular del ovocito, y el PLG está presente en el fluido que baña al ovocito en el folículo ovárico (Beers, 1975) por lo que la conclusión inmediata es que el ovocito es capaz de unir moléculas de PLG.

En el experimento 4.1. de nuestro estudio observamos que los ovocitos de vaca madurados *in vitro* presentaban marcaje positivo a la presencia de PLG tanto en una localización que podríamos denominar peri-oolema como en la región más externa de la

ZP. Este hecho, a todas luces lógico si pensamos que estos ovocitos han estado en contacto con el fluido folicular antes de ser extraídos por nosotros, y que por lo tanto han podido unir PLG procedente de este fluido, no por no resultar sorprendente es menos novedoso, ya que en la vaca no se había observado. Pero lo más interesante, a nuestro modo de ver, fue el resultado que obtuvimos cuando sometimos a los ovocitos de vaca al mismo tratamiento de inmunolocalización de PLG tras haber sido fecundados *in vitro*, ya que el marcaje desapareció por completo del oolema y parcialmente de la ZP.

Este hecho nos hizo pensar que nuestra hipótesis de partida era acertada, y que tras la activación del ovocito por parte del espermatozoide, el PLG unido al oolema o a la ZP es transformado en PLA, que sería la responsable última del efecto observado en los resultados de fecundación ya comentados. En nuestro estudio, al añadir PLG exógeno, como en condiciones fisiológicas probablemente ocurra por el contacto del ovocito con el fluido oviductal, lo que en última instancia se consiguió fue que, además del PLG de origen folicular unido al ovocito, la ZP y el oolema continuaran uniendo moléculas de PLG dentro del sistema dinámico establecido en el medio de cultivo, conforme dicho PLG iba convirtiéndose en PLA durante la interacción de los gametos. De ahí las diferencias observadas en los resultados de fecundación *in vitro* entre los ovocitos del grupo control, que sólo contaban con el posible PLG unido de origen folicular, y los ovocitos de los grupos experimentales, que fueron capaces de unir PLG adicional añadido por nosotros al medio de cultivo.

Cuando repetimos este mismo experimento en la especie porcina, observamos algo parecido. Los ovocitos de cerda madurados *in vitro* presentan PLG en la parte más externa de su ZP que, como en el caso de la vaca, podría tener origen en el fluido folicular. También pudimos ver marcaje próximo al oolema.

Si pensamos en el modelo fisiológico, al menos en algunas especies como la cerda o la hembra de hámster, el paso del ovocito por el oviducto produce cambios en el oolema entre los que podría encontrarse su capacidad para unir moléculas de PLG (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002), o bien cambios en la ZP que permitan el paso de PLG desde ésta hacia el oolema. En este sentido, cambios en las propiedades químicas de la ZP de ovocitos porcinos debidos a su paso por el oviducto ya han sido demostrados previamente por nuestro grupo y otros, por ejemplo, el referido al aumento de la resistencia de esta estructura a la digestión con pronasa mediado por la unión de la glicoproteína específica del oviducto, OVGP1 (Coy *et al.*, 2008a; Kolbe y Holtz, 2005), a la ZP. Teniendo esto en cuenta, sería interesante analizar si, en condiciones fisiológicas, el paso de los ovocitos

de vaca por el oviducto modifica de modo diferente al de la cerda su capacidad para unir o traslocar PLG. Es sabido que la composición de la ZP bovina y porcina no es exactamente la misma, aunque presenten el mismo número y tipo de glicoproteínas (Hedrick y Wardrip, 1986; Noguchi *et al.*, 1994) y que la composición del fluido oviductal, al menos en cuanto a su efecto sobre la resistencia de la ZP a la degradación proteolítica, es también diferente (Avilés *et al.*, 2010; Coy y Avilés, 2010; Coy *et al.*, 2008a).

Si estas diferencias entre los ovocitos bovinos y porcinos pudieran comprobarse, y asumiendo que el sistema PLG-PLA contribuye a disminuir la polispermia, sería interesante averiguar si existe alguna relación entre ambos hechos. Es posible que la presencia de PLG en el oolema de los ovocitos bovinos madurados *in vitro* permita la generación de PLA en el sistema de FIV de un modo más eficiente que en el caso de la especie porcina, y que este hecho contribuya a la mejor regulación de la polispermia observada en la fecundación *in vitro* bovina.

De hecho, tras la fecundación, los ovocitos porcinos perdieron mayoritariamente su marcaje positivo a la presencia de PLG unido a la membrana plasmática. Sin embargo, en algunos casos éste aún fue visible, a diferencia de lo observado en la vaca. La explicación más plausible, en nuestra opinión, es que estos ovocitos no hubieran sido activados por un espermatozoide y por tanto no hubieran liberado los activadores responsables de la conversión del PLG en PLA. Dado que los porcentajes de fecundación en la especie porcina no alcanzaron el 100%, esta posibilidad no puede ser descartada. Alternativamente, este resultado podría estar también relacionado con las diferencias en los niveles de polispermia entre ambas especies, y sería debido a una reacción incompleta del PLG unido al oolema por una inadecuada activación del mismo.

En cuanto a la ZP, tanto los ovocitos bovinos fecundados como los porcinos conservaron parte de la señal, pero siempre de menor intensidad que en el caso de los ovocitos no fecundados y mayoritariamente relacionada con la presencia de los espermatozoides unidos a la ZP. Dado que el número medio de espermatozoides que se unieron a la ZP bovina en nuestras condiciones experimentales varió entre 1 y 3, y que dicho número en la especie porcina llegó en ocasiones hasta 86, el marcaje del PLG en la ZP tras la fecundación fue más evidente en la cerda que en la vaca.

Por lo tanto, nuestros resultados en las dos especies estudiadas fueron mayoritariamente coincidentes con la hipótesis principal de este trabajo, y confirmaron la posibilidad de que el PLG unido a los ovocitos y posteriormente activado a PLA como

consecuencia de la interacción con el espermatozoide, tuviera un efecto significativo en los resultados de fecundación.

### 7.2.2. Inmunolocalización de tPA

El siguiente paso consistió en averiguar si el tPA también podía ser localizado en la membrana plasmática y/o en la ZP de ovocitos bovinos y porcinos, para lo que realizamos el experimento 4.2. Las referencias previas sobre la presencia de tPA en ovocitos, a diferencia del caso del PLG, son bastante numerosas. De hecho, esta serín proteasa, al margen de su importancia como marcador de riesgo de enfermedades cardiovasculares, y su utilización terapéutica en el tratamiento del infarto de miocardio o la embolia pulmonar aguda (Borisov *et al.*, 2009), es objeto de numerosos estudios desde hace 30 años por su papel en la regulación de la función ovárica, y más concretamente, del proceso de ovulación (Liu, 2004a).

Como hemos visto en los resultados del experimento 4.2., la presencia de tPA en la región del oolema y en la ZP de los ovocitos de vaca y de cerda madurados *in vitro* fue claramente evidenciada con el anticuerpo utilizado. En el oolema, resultó llamativo el hecho de que, en uno de los ovocitos de vaca observados, no se detectara marcaje en las proximidades del corpúsculo polar, observándose aquí un dominio libre de tPA. Si bien este tipo de dominios han sido descritos en ratón, por ejemplo, referentes a los dominios libres de gránulos corticales (Deng *et al.*, 2003; Ducibella *et al.*, 1988), y también, aunque menos frecuentemente en la especie porcina (Sun *et al.*, 2001), no hemos encontrado datos similares en la especie bovina que nos pudieran ayudar a interpretar su significado biológico. Sin embargo, si aceptáramos que, como indicaron Rekkas *et al.* (Rekkas *et al.*, 2002), el tPA está presente en el contenido de los gránulos corticales de la especie bovina, y supusiéramos que, aunque no haya sido descrito hasta ahora, existe el dominio libre de gránulos corticales en esta especie en las proximidades del huso meiótico, nuestros resultados se explicarían fácilmente. Es más, aún sin relación alguna con los GC, la existencia de una zona en el oolema libre de tPA también podría tener relevancia fisiológica.

Observando con mayor detenimiento la ZP de ovocitos bovinos y porcinos pudimos ver que presentó marcaje positivo de mayor intensidad cuanto más hacia el exterior la observáramos. La razón de esta intensidad creciente podemos encontrarla en el hecho de que, al igual que el PLG, el tPA unido a la ZP de estos ovocitos podría tener un origen

folicular. Han sido numerosos los trabajos que han demostrado que las células del *cumulus oophorus* tienen capacidad para expresar el ARNm de tPA y sintetizar tPA, sobre todo, aunque no exclusivamente, en respuesta a la FSH (Ny *et al.*, 1985; Ny *et al.*, 1987; O'Connell *et al.*, 1987). Bajo esta premisa, el tPA en la parte exterior de la ZP podría proceder de las células foliculares, y por ello disminuiría en cantidad conforme nos acercamos al espacio perivitelino, ya que cuanto más nos alejamos de las uniones entre las células del *cumulus* y el borde exterior de la ZP menos intensa sería la señal de tPA que detectaríamos.

En cuanto al tPA descrito en el oolema, y sin descartar que pudiera proceder de las células foliculares, tenemos que indicar que existen referencias afirmando que los ovocitos de rata, ratona, mona Rhesus y mujer tienen la capacidad de sintetizar tPA (Huarte *et al.*, 1985; Liu, 2004b; Liu *et al.*, 1986), aunque en la mayoría de ellas no se aclara si están presentes o no las células del *cumulus* en los experimentos realizados y se habla de ovocitos aislados o complejos *cumulus*-ovocito indistintamente. Quizá una excepción es el trabajo de Bicsak *et al.* (Bicsak *et al.*, 1989b), en el que empleando la rata como modelo animal, demostraron, en ovocitos libres de células del *cumulus*, que su contenido en tPA aumentaba conforme avanzaba la maduración meiótica y que contenían tPA ARNm.

Profundizando algo más en esta idea, revisamos algunos trabajos relacionados, como el de Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1987b). Estos autores localizaron altos niveles de ARNm para tPA mediante Northern blot en ovocitos primarios de ratón y bajos niveles en ovocitos secundarios, desapareciendo totalmente la señal en ovocitos fecundados. Consecuentemente, sugirieron que el ARNm para tPA se degrada poco después de la maduración meiótica y que el gen para tPA no se transcribe en los embriones tempranos en niveles detectables. En este sentido, Alizadeh *et al.* (Alizadeh *et al.*, 2005) confirmaron que el ARNm del tPA es uno de los transcritos de origen maternal en el ratón que experimentan una rápida degradación después de la fecundación porque, según estos autores, no es necesario para el desarrollo embrionario temprano.

En otro estudio, Carroll *et al.* (Carroll *et al.*, 1993) fueron capaces de detectar actividad tPA en embriones en estadio de 4 células y mórula cuando éstos se recogieron directamente del aparato reproductor de las ratonas mientras que dicha señal era inexistente cuando los embriones (en los mismos estadios) procedían de cultivos *in vitro*. Estos resultados demostraron que el tPA en los embriones era adquirido durante el tránsito por el oviducto, ya que en otros experimentos observaron que las células



oviductales expresaban tPA y uPA y que el fluido oviductal contiene tPA (Carroll *et al.*, 1993). Finalmente, para aclarar si el tPA presente en ovocitos y embriones era de origen extracelular o intracelular, realizaron otro experimento en el que trataron a los ovocitos y embriones con pronasa, que como es sabido tiene la capacidad de degradar las proteínas extracelulares, incluyendo la ZP. Confirmando los datos de Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1987b) y los suyos propios, comprobaron que en los ovocitos secundarios la actividad tPA no se vio afectada por el tratamiento con pronasa, mientras que en cigotos y embriones, dicha actividad desapareció o, lo que es lo mismo, el tPA detectado era de origen extracelular en los embriones y de origen intracelular en los ovocitos primarios y secundarios.

Tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, todos los ovocitos empleados en nuestro estudio libres de ZP fueron pre-tratados con pronasa antes de incubarlos con los correspondientes anticuerpos, pero también se hicieron controles eliminando la ZP con ácido Tyrodes y empleando ovocitos no permeabilizados, obteniéndose la misma señal. Por lo tanto, hemos de concluir, en principio, que el marcaje positivo detectado con respecto a tPA (y como veremos posteriormente, también respecto a uPA) en el oolema de los ovocitos estaría indicando la presencia extracelular, posiblemente unido a algún receptor en la membrana, de este activador. En nuestra opinión, el marcaje se debería a la secreción continua y discreta de tPA en los ovocitos maduros para activar el PLG y contribuir a la fluidez del líquido extracelular (LEC) en cualquier circunstancia (Vassalli *et al.*, 1991), aspecto éste que discutiremos con mayor detalle posteriormente.

Aún así, serían necesarios estudios adicionales para confirmar si el tPA presente en los ovocitos bovinos y porcinos detectados en nuestro estudio procede del sintetizado por las células del *cumulus* o si los propios ovocitos pueden producirlo. Un estudio de Park *et al.* (Park *et al.*, 1999) con ovocitos bovinos en presencia y ausencia de células del *cumulus* indicó que hasta las 24 horas de cultivo *in vitro* no se detectó actividad tPA en los COCs, es decir, coincidiendo con la maduración meiótica y la aparición del ovocito secundario, lo que no coincide con los datos de Huarte (Huarte *et al.*, 1987b) en ratón. Además, estos autores indicaron que, inmediatamente tras la aspiración de los COCs de los folículos ováricos, la actividad de los PAs fue nula, y tras 24 horas del cultivo se detectó actividad tPA en las células del *cumulus* pero no en los ovocitos aislados. No hemos encontrado datos consistentes en la bibliografía sobre la capacidad de síntesis de tPA en ovocitos desnudos porcinos, aunque sí se ha demostrado actividad tPA en complejos *cumulus*-ovocito de esta especie (Kim y Menino, 1995).

Al margen del origen del tPA, los estudios descritos anteriormente nos ofrecieron una interesante pista para explicar el posible mecanismo por el que la PLA ejercía el efecto que habíamos observado en nuestros experimentos de fecundación *in vitro*, reduciendo el número de espermatozoides unidos a la ZP y la penetración.

En nuestros experimentos *in vitro*, y en ausencia de factores oviductales que pudieran afectar los resultados, el desencadenante de la salida del tPA desde el ovocito secundario podría ser el propio espermatozoide que, al activar al ovocito, provocaría la salida de tPA al espacio extracelular o a la cara externa del oolema en cantidades mayores a las necesarias para mantener el equilibrio proteolítico necesario para el control de la densidad del LEC. Esta salida, independientemente de que el tPA estuviera en el interior de los gránulos corticales o no, sería la que contribuiría a la activación del PLG unido a la membrana y a la ZP para generar PLA, responsable en última instancia de la disminución de la unión y penetración al ovocito.

D'Alessandris *et al.* (D'Alessandris *et al.*, 2001), sin embargo, tienen otra explicación para la ausencia de tPA en los ovocitos fecundados. Según estos autores, tras la expansión completa del *cumulus*, el ovocito de ratona promueve la degradación de la matriz extracelular rica en ácido hialurónico que se encuentra entre estas células secretando tPA. Este tPA sería también el factor no identificado que Nagyová *et al.* (Nagyová *et al.*, 2000) encontraron en ovocitos porcinos, el cual no permitió la organización del hialuronano en la matriz del *cumulus* murino. Lo que no explican estos autores es cual sería la señal desencadenante para la salida del tPA desde el ovocito, que en nuestro caso, y para el modelo que proponemos, sugerimos es el espermatozoide. Además, hemos de recordar que, aunque en la especie bovina las células del *cumulus* estuvieron presentes durante los experimentos de fecundación *in vitro*, en la especie porcina los ovocitos estaban prácticamente desnudos, por lo que, en este caso, el origen de la salida de tPA y activación del PLG habría que buscarlo en los ovocitos y no en las células del *cumulus* porcinas.

De hecho, observando nuestros resultados, esta idea adquiere todo su sentido. Los ovocitos bovinos, tras la fecundación, fueron claramente negativos al marcaje con el anticuerpo anti-tPA en el oolema, lo que coincide con lo descrito por Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1987b) y Carroll *et al.* (Carroll *et al.*, 1993). En los ovocitos porcinos, el marcaje sin embargo no desapareció por completo en todos los casos. Algunos de los ovocitos que empleamos, aún después de la fecundación, presentaron señal positiva a la presencia de tPA en su oolema. Este hecho, que indica una salida incompleta de tPA al exterior,

coincide con nuestra hipótesis que relaciona el contacto del espermatozoide con el oolema y la activación del ovocito con la salida de PAs. Así, pudimos comprobar que en los ovocitos donde se observaba señal de tPA en forma de una línea continua alrededor del oolema tras la fecundación, también se observaba señal de PNA, indicando una salida incompleta de los GCs. Por el contrario, en ovocitos en los que se observó ausencia de señal para PNA (indicativa de la salida completa de los GCs), la señal para tPA se observó como una línea discontinua y difusa alrededor de la región del oolema.

En cuanto a la ZP, tanto en ovocitos bovinos como porcinos mantuvo restos de señal para tPA, aunque esta señal siempre apareció asociada a los lugares donde se encontraban espermatozoides unidos y por lo tanto fue menos intensa en la vaca que en la cerda.

De nuevo, como hemos sugerido para el PLG, una de las posibles razones de esta diferencia entre los ovocitos bovinos y los porcinos podríamos encontrarla en los diferentes niveles de polispermia que se obtienen tras la FIV en cada una de estas especies. Si realmente el sistema PLG-PLA está implicado en la regulación de la entrada del espermatozoide al ovocito, y si el mecanismo implica la salida de activadores (tPA en este caso) desde el ovocito tras la activación espermática, entonces la permanencia del activador en el oolema sería indicativa de una inadecuada o incompleta reacción del ovocito porcino, al contrario que el bovino, al contacto con el espermatozoide. La alta presencia de tPA en las regiones de la ZP donde se encontraban espermatozoides unidos también apoyaría nuestra hipótesis, relacionando la actividad focalizada de tPA con la capacidad de los espermatozoides para atravesar la ZP.

Otro elemento que no podemos olvidar en nuestro análisis es el espermatozoide. Ya hemos indicado que la presencia de tPA y uPA en los espermatozoides había sido previamente demostrada (Huarte *et al.*, 1987a; Liu *et al.*, 1996; Smokovitis *et al.*, 1992). Sin embargo, y puesto que no hemos realizado experimentos propios para localizar los diferentes componentes del sistema PLG-PLA en el gameto masculino en el presente trabajo, su papel en el complejo mecanismo que estamos intentando describir lo analizaremos más adelante.

### 7.2.3. Inmunolocalización de uPA

De un modo similar, los resultados relativos a la localización de uPA en los ovocitos bovinos y porcinos del experimento 4.3. contribuyeron a la construcción de nuestros argumentos a favor de la hipótesis de este estudio. Tanto en la especie bovina como en la porcina, uPA estuvo claramente presente en la región del oolema de los ovocitos madurados *in vitro*, al igual que en la ZP. De nuevo podemos remontarnos al origen folicular de nuestros ovocitos para explicar la presencia de uPA en los mismos. Ya hemos comentado que las células del *cumulus* incrementan dramáticamente la síntesis de uPA tras la expansión y que se ha relacionado dicha síntesis con la degradación de la matriz extracelular y la dispersión de estas células (D'Alessandris *et al.*, 2001). Aunque no hemos encontrado datos sobre la síntesis de uPA en ovocitos de otras especies, Park *et al.* (Park *et al.*, 1999) detectaron actividad uPA en ovocitos bovinos madurados *in vitro* y, aunque no pudieron explicar el origen de dicha actividad, sugirieron varias alternativas: i) que los ovocitos la adquirieran mediante el transporte de uPA desde las células del *cumulus* via *gap junctions*; ii) que algunas señales procedentes de estas células estimularan la producción de uPA por parte del ovocito, o iii) que el ovocito sintetizara una forma inactiva de uPA que requiriera de las células del *cumulus* para convertirla en una forma activa. Sea cual sea el mecanismo, los datos de estos autores coinciden con los nuestros. A diferencia del tPA, no hemos encontrado datos sobre la presencia de uPA en ovocitos porcinos.

Dado que en nuestros experimentos los ovocitos bovinos y porcinos sin ZP fueron tratados con pronasa pero el resultado fue igual al observado en los controles con ácido Tyrodes, deberíamos concluir, al igual que en el caso del tPA, que el marcaje positivo de uPA en el oolema de estos ovocitos se debe a la localización extracelular de este activador. Para corroborarlo, serían necesarios estudios adicionales con técnicas de microscopía electrónica que actualmente estamos realizando.

Tras la fecundación, pudimos observar que uPA desaparecía de la región de la membrana plasmática de los ovocitos bovinos y parcialmente de la de ovocitos porcinos, mientras que continuaba siendo evidente en la ZP de ambas especies. El marcaje se circunscribió más específicamente a los lugares donde se observaban espermatozoides unidos a la ZP. La especificidad de especie para los diferentes componentes del sistema PLG-PLA en algunas de sus múltiples acciones es algo que ya hemos observado en el caso del PLG en el presente estudio y que otros autores han descrito, especialmente en relación con el diferente patrón de expresión de los PAs en las células de la granulosa y

de la teca en ratona y mujer, por citar un ejemplo (Canipari *et al.*, 1987; Epifano *et al.*, 1994). Al igual que en el caso del tPA, podríamos asociar esta falta de pérdida completa de señal de uPA del ovocito porcino con una inadecuada activación del mismo y por lo tanto con una mayor incidencia de polispermia en esta especie. En cuanto al marcaje en ZP tras la fecundación, consideramos que pudo tener, mayoritariamente, un origen espermático, por lo que, como ya hemos comentado, lo discutiremos posteriormente. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que las especies bovina y porcina regulen de manera diferente la actividad del sistema PLG-PLA en el entorno de la fecundación.

En este punto, nos gustaría analizar separadamente lo que ocurre en las dos micro-regiones que estamos observando a lo largo de este apartado, es decir, el oolema y la ZP. Como es sabido, entre ambas se encuentra el espacio perivitelino (EPV), y como los PAs pueden proceder del ovocito, punto de vista que estamos analizando hasta ahora, pero también del espermatozoide o del fluido oviductal, creemos conveniente centrarnos en cada una de ellas separadamente para entender mejor los resultados obtenidos.

En el oolema, el uPA de supuesto origen ovocitario, siguiendo nuestra hipótesis de trabajo, sería “secretado” en respuesta al contacto del espermatozoide. Hemos visto en la revisión bibliográfica que el receptor de uPA es una glicoproteína anclada a membrana por un enlace glicosilfosfatidilinositol con un dominio de unión a uPA y dos dominios de unión a vitronectina (Ploug *et al.*, 1991). Además, se ha demostrado que el receptor de uPA se puede unir a integrinas en sitios diferentes de los sitios de unión a vitronectina (Irigoyen *et al.*, 1999). Por otra parte, en el ovocito, se ha sugerido que las integrinas, ancladas en el oolema, actúan como receptores de las proteínas espermáticas ADAM (Kaji y Kudo, 2004). Pero en el caso que nos ocupa, dichas integrinas podrían servir también para la unión del receptor de uPA, por lo que, existiendo el receptor en el oolema, se justificaría plenamente la unión del activador al mismo. Así, sería factible que la unión espermatozoide-oolema (o espermatozoide-integrina, en un lugar de unión diferente al de uPAR) desencadenara la liberación del uPA intraovocitario (posiblemente mediante un cambio conformacional en la integrina, (Binder *et al.*, 2007) y que este uPA se uniera a su receptor (unido a su vez a integrinas presentes en el oolema). Este modelo está representado en la Figura 7.1.

Como ya hemos comentado, el uPA se secreta como una proteína inactiva de cadena sencilla, pero se convierte en la forma activa de doble cadena debido al procesamiento proteolítico por parte de la PLA. Como en el oolema hemos demostrado previamente que

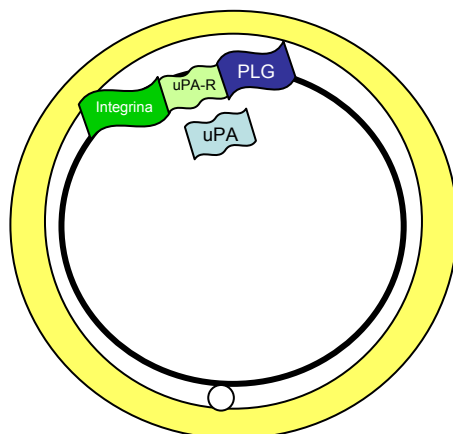
existe PLG unido, y el uPA de cadena simple puede actuar sobre dicho PLG para generar PLA, se formaría uPA de cadena doble en esta micro-región. Finalmente, el uPA de doble cadena dirigiría la rápida activación del PLG unido al oolema, transformándolo en PLA, que ejercería el efecto que hemos comentado ampliamente en los experimentos 1 a 3 hasta que el PLG se agotara.

Otra opción posible sería que el receptor para uPA procediera del espermatozoide. Este modelo se representa en la figura 7.2. Aunque el espermatozoide que llega al oolema ya ha sufrido, teóricamente, la reacción acrosómica y por lo tanto habría perdido el uPA unido a la membrana plasmática descrito por Huarte *et al.* (Huarte *et al.*, 1987a), se ha descrito un receptor de uPA llamado SAMP14 que permanece en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides reaccionados (Shetty *et al.*, 2003). Dado que también se ha demostrado que uPA induce una respuesta quimiotáctica en los espermatozoides (Ding y Xiong, 2005) sería posible que la presencia de uPA en el oolema atrajera a los espermatozoides tras atravesar la ZP y que la unión de SAMP14 espermático a uPA ovocitario (o a integrinas, provocando secreción de uPA) desencadenara la activación del PLG y la acción de la PLA o mediara algún otro proceso de señalización intracelular, como ocurre con uPA en el caso de la implantación embrionaria (Binder *et al.*, 2007).

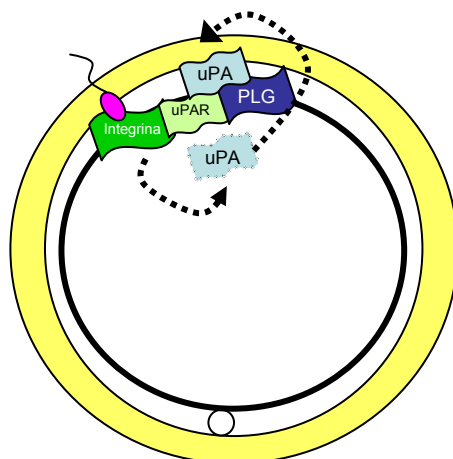
Las dos hipótesis planteadas vendrían avaladas por trabajos realizados en otros tipos celulares, en los que se comprobó que uPAR es una molécula altamente multifuncional, que participa en la adhesión celular interactuando y modulando la afinidad de las integrinas con sus correspondientes ligandos, y que dicha interacción influye en la motilidad celular (Plesner *et al.*, 1997).

**Figura 7.1.** Posible modelo de acción de uPA en el ovocito. **A)** En el ovocito maduro, uPAR está unido a las integrinas ancladas en el oolema el cual, a su vez, presenta sitios de unión a los que se fija el PLG. **B)** Cuando el espermatozoide contacta con el oolema, posiblemente mediante su unión a integrinas, se produce la secreción de uPA, que se une a su receptor. **C)** El complejo uPAR-uPA en el oolema activa al PLG generando PLA, que difunde y ejerce su efecto en el EPV o en la ZP.

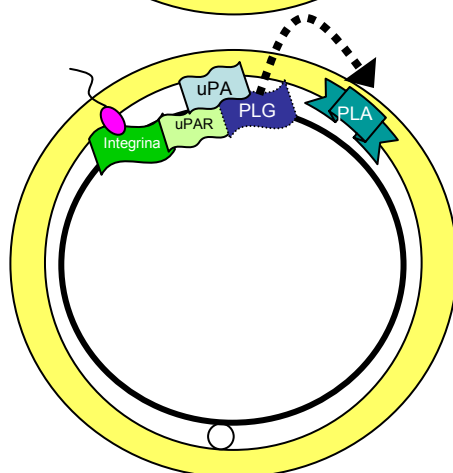
**A)**



**B)**

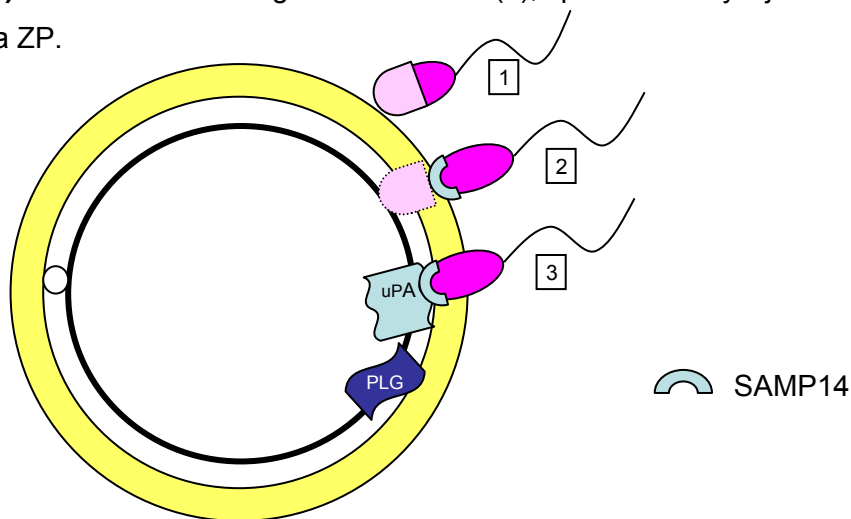


**C)**

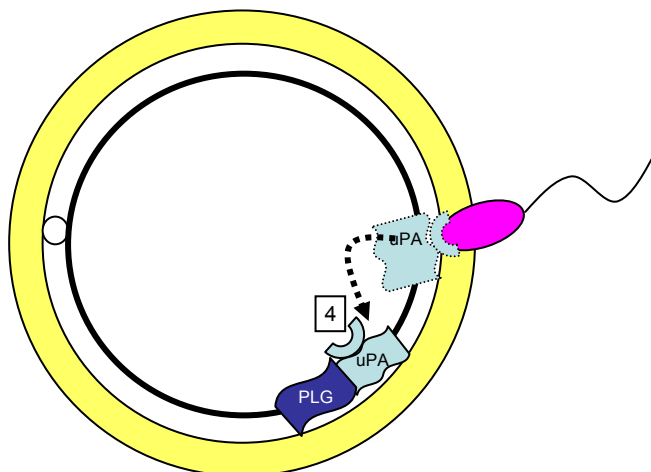


**Figura 7.2.** Posible modelo de acción de uPA en el ovocito. **A)** Cuando el espermatozoide contacta con la ZP (1), se inicia la reacción acrosómica (2) y el receptor de uPA denominado SAMP 14, situado en la membrana acrosomal interna del espermatozoide queda expuesto, uniéndose a uPA del oolema (3). **B)** El complejo uPA-SAMP 14 se une al PLG del oolema (4). **C)** El PLG se activa generando PLA (5), que difunde y ejerce su efecto en el EPV o en la ZP.

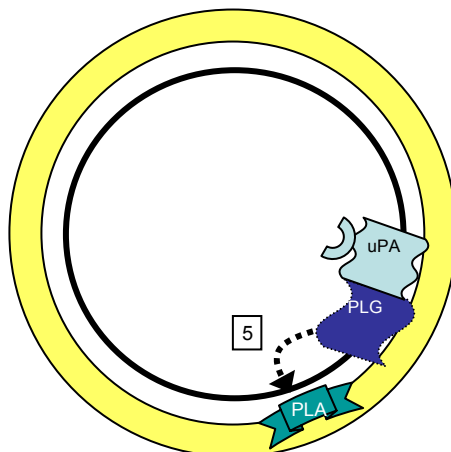
**A)**



**B)**



**C)**





En cuanto a la ZP, el mecanismo podría ser algo diferente. En esta micro-región no se encontrarían las integrinas o el receptor de uPA, por lo que la actividad biológica de uPA sobre el PLG sería menor. En contraposición, el origen del uPA no sería, probablemente, intraocitario, sino que provendría de los espermatozoides unidos a la ZP, y esto, en función del número de espermatozoides de que se trate, podría significar una mayor o menor cantidad de uPA disponible. En células tumorales se ha demostrado que aquellas que tienen uPA unido poseen una capacidad invasiva mucho mayor que las que no lo tienen (Ossowski, 1988; Ossowski *et al.*, 1991). En este sentido, sería interesante comprobar si el número de sitios de unión para uPA de los espermatozoides tiene alguna relación con su capacidad para atravesar la ZP. Ya indicó Liu (Liu, 2007) que uPA, pero no tPA, estimula la motilidad, induce la reacción acrosómica y estimula la capacidad de los espermatozoides de fecundar los ovocitos maduros, lo cual podría estar relacionado con su capacidad para atravesar la ZP.

Resumiendo, si los experimentos 1 a 3 nos habían llevado a la deducción de que el sistema PLG-PLA tenía un papel en el proceso de fecundación, reduciendo el número de espermatozoides que se unían a la ZP y que penetraban el ovocito, el experimento 4 nos confirmó que todos los actores necesarios para la conversión del PLG en PLA en nuestro sistema de FIV estaban presentes en los ovocitos bovinos y porcinos madurados *in vitro*, y que después de la fecundación se producían cambios evidentes en la localización de dichos actores (PLG, tPA y uPA), que desaparecían del ovocito en su mayoría. No obstante, la visión que hemos ido presentando hasta ahora, intentando facilitar la comprensión de los resultados, ha sido claramente parcial. No hemos comentado más que ligeramente el papel de los espermatozoides en nuestro sistema, y tampoco hemos tenido en cuenta la presencia de los inhibidores de los PAs, especialmente del PAI-1, cuya secreción por parte de los ovocitos está demostrada (Canipari *et al.*, 1995). Es evidente que no podemos abarcarlo todo en un único estudio, y por lo tanto, intentaremos ceñirnos a los resultados obtenidos y a las evidencias que éstos nos aportan, aunque irremediablemente, en el siguiente apartado, intentaremos ir ampliando la visión ofrecida al discutir los experimentos 5 a 9, conducentes todos ellos a cumplir nuestro tercer objetivo: identificar, al menos parcialmente, el mecanismo mediante el cual el sistema PLG-PLA afecta a los resultados de fecundación.

### 7.3. Mecanismo de acción del sistema plasminógeno/plasmina en la fecundación

Una de las primeras opciones que barajamos para explicar el mecanismo mediante el cual la PLA disminuía la penetración fue que este enzima estuviera implicado en la fragmentación de la ZP2, es decir, que fuera la “ZP2 proteinasa” descrita por Moller y Wassarman en ratón (Moller y Wassarman, 1989) que produce el endurecimiento post-fecundación de la ZP y es un elemento esencial en la reacción de zona y el control de la polispermia. Como es sabido, estos autores demostraron que la activación del ovocito producía la aparición de un fragmento de ZP2 al que denominaron ZP2f, de un peso molecular aparente entre 21 y 34 kDa. Mayores cantidades de ZP2f se correlacionaron con aumentos en los tiempos de digestión de la ZP y por este motivo sugirieron que el incremento de la resistencia de la ZP a la proteólisis podría estar causado por la fragmentación de ZP2 y la consecuente aparición de ZP2f. Ya hemos comentado al inicio de esta discusión que Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1992) propusieron al sistema PLG-PLA como candidato a ser esta “ZP2 proteinasa” al observar un incremento en la resistencia de la ZP cuando bloquearon la actividad tPA con un anticuerpo específico. Sin embargo, este hecho no ha podido ser confirmado ya que ni la aparición de ZP2f ni el incremento de la resistencia de la ZP a la proteólisis han podido relacionarse con la actividad PLA en trabajos posteriores. De hecho, recientemente, incluso la relación entre la aparición de ZP2f y el endurecimiento de la ZP en ratón ha sido desmentida en un brillante artículo empleando ratones mutantes con ZP2 incapaz de fragmentarse (Gahlay *et al.*, 2010).

En nuestro caso, en los experimentos 5 y 6, no pudimos observar ningún incremento en la resistencia de la ZP a la digestión proteolítica al tratar los ovocitos con PLG ó PLA, ni en la especie bovina ni en la porcina. Los tiempos de digestión no variaron. Este resultado, no obstante, no nos causó ninguna sorpresa ya que en las dos especies mencionadas, nosotros ya habíamos demostrado previamente que no se produce un endurecimiento de la ZP como consecuencia de la activación del ovocito por el espermatozoide (Coy *et al.*, 2008a), sino que este endurecimiento es previo y motivado por el contacto del ovocito con el fluido oviductal. Sin embargo, y puesto que en el ratón sí parece existir un endurecimiento post-fecundación de la ZP, aún quedaría por corroborar si el sistema PLG-PLA está implicado en este proceso en esta especie. Nosotros lo consideramos poco probable ya que otros autores han observado que la adición de PLA o de PLG activado mediante estreptoquinasa al medio de cultivo no sólo no “endurece” la ZP, en el sentido de que no la hace más resistente a la degradación proteolítica, sino que produce el efecto contrario, es decir la “reblandece”, disminuyendo el tiempo que tarda en

digerirse. Este ha sido el caso en el hámster (Jimenez-Diaz *et al.*, 2002), en el cerdo (Sa *et al.*, 2006) o en la vaca (Cannon y Menino, 1998).

En cuanto a la participación del sistema PLG-PLA en la aparición de la ZP2f, Cannon y Menino (Cannon y Menino, 1998) observaron que de los 4 polipéptidos de 76, 65 23 y 22 kDa, respectivamente, obtenidos mediante SDS-PAGE en un grupo control de ZPs bovinas, 3 fueron degradados por la adición de PLA al medio de incubación, y además apareció una nueva banda de 45 kDa como resultado de la degradación del polipéptido de 76k Da, pero no relacionaron específicamente a la PLA con la fragmentación de ZP2.

Por lo tanto, tras realizar este experimento, concluimos que el sistema PLG-PLA no ejercía su efecto en la regulación de la penetración espermática provocando un “endurecimiento” de la ZP y decidimos investigar otros factores para explicar el mecanismo mediante el que se producían los efectos observados. Entre estos factores, pensamos que uno de los más importantes eran los espermatozoides. Hasta el momento, nos habíamos limitado a añadir PLG o PLA al medio de fecundación y a analizar los resultados a las 18-20 horas del contacto espermatozoide-ovocito, observando unos cigotos o unos ovocitos polispermicos morfológicamente normales, capaces de formar pronúcleos, etc. Sin embargo, nada podía asegurarnos que la disminución observada en la penetración y en la unión espermatozoide-ZP no pudiera deberse a un efecto nocivo del PLG o la PLA añadidos al medio sobre los espermatozoides, disminuyendo su viabilidad o su funcionalidad. Por este motivo, diseñamos el experimento 7, y en él pudimos comprobar que ni la PLA ni el PLG, a los 30 minutos de estar en contacto con los espermatozoides, tenían ningún efecto perjudicial en su funcionalidad. Sabíamos que en nuestro sistema de FIV la adhesión del espermatozoide a la ZP, al menos en la especie porcina, se produce muy rápidamente, en unos pocos minutos, y por lo tanto consideramos que 30 minutos eran suficientes para detectar cualquier problema que hubiera podido afectar a los espermatozoides como consecuencia del tratamiento. Pero tanto en la especie bovina como en la porcina, la adición de PLG no perjudicó en absoluto a la capacitación de los espermatozoides ni a su viabilidad, como observamos en el experimento 7.1. Al contrario, la adición de PLA incrementó en la especie bovina (aunque no en la porcina) el porcentaje de espermatozoides capacitados y vivos. Esto, en cualquier caso, podría haber aumentado el rendimiento de la fecundación, pero no disminuirlo, por lo que concluimos que los resultados obtenidos en los experimentos 1 a 3 no se explicaban por una alteración en la funcionalidad espermática.

Los datos del experimento 7.2 nos confirmaron esta idea, ya que de nuevo comprobamos que ni la adición de PLG ni la de PLA al medio de FIV provocaron una desestabilización del acrosoma mayor que la del grupo control. No sólo eso, sino que además, en la especie bovina tanto el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto como el porcentaje total de espermatozoides vivos fueron superiores a los del grupo control cuando se adicionó PLA. Estos resultados podrían parecer contradictorios a los obtenidos por Taitzoglou *et al.* (Taitzoglou *et al.*, 2003) en la especie bovina o Sa *et al.* (Sa *et al.*, 2006) y Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2009) en la especie porcina, ya que estos autores describen un aumento en el porcentaje de espermatozoides vivos y con el acrosoma reaccionado tras el tratamiento con PLA. Sin embargo, en los artículos mencionados los tiempos a los que se evaluó el estatus acrosomal tras la incubación con PLA variaron desde 2 hasta 6 horas, y en nuestro caso, como hemos indicado, el tiempo de permanencia de los espermatozoides con la solución de PLA fue sólo de 30 minutos.

En nuestra opinión, y sabiendo que en 5-10 minutos ya existe un elevado porcentaje de espermatozoides unidos a la ZP en nuestro sistema de FIV porcina, tiene más sentido evaluar el estatus acrosomal en periodos de tiempo más cortos como el de 30 minutos, puesto que la simple permanencia de los espermatozoides en un medio capacitante como los que empleamos para la FIV ya induce reacciones acrosómicas espontáneas y muerte de los gametos masculinos que podrían enmascarar los porcentajes de reacciones acrosómicas verdaderas en los espermatozoides unidos o uniéndose a la ZP. Estas últimas reacciones acrosómicas son las que tienen interés real en nuestro estudio.

Por otra parte, el hecho de que la permanencia de los espermatozoides en un medio con PLA durante periodos largos de tiempo induzca reacción acrosómica, en ausencia de ovocitos, puede deberse sin duda a la acción proteolítica de la PLA pero no tiene el sentido biológico que nosotros estamos intentando encontrar cuando incluimos ambos gametos en el mismo medio de cultivo, en presencia de PLA, permitiendo la interacción entre ellos (en este caso, interacción consistente en la unión espermatozoide-ZP).

Estos resultados nos llevaron a suponer que en el oviducto, donde los espermatozoides estarían expuestos a concentraciones teóricamente similares de PLG a las empleadas por nosotros, y donde sería posible la generación de PLA por parte de los activadores, no ocurriría tampoco ninguna alteración perjudicial para la funcionalidad espermática por efecto de este sistema, sino que su acción tendría otros efectos colaterales, relacionados con la adhesión al epitelio oviductal, la capacitación, o la facilitación del desplazamiento a través del altamente viscoso fluido oviductal.

En este sentido, Georgiou *et al.*, (Georgiou *et al.*, 2007) observaron que el fibrinógeno en el fluido oviductal se sobreexpresa como consecuencia de la llegada de los espermatozoides. Esto sería compatible con la idea de que los PAs de origen oviductal se unieran a PLG unido a su vez a fibrina (tPA), libre en el fluido (uPA) o unido a las células epiteliales (tPA, uPA) y estimularan la generación local de PLA, la cual, en contacto con los espermatozoides unidos a su vez al epitelio oviductal podría provocar una proteólisis limitada sobre la superficie espermática, compatible con las modificaciones de la membrana que ocurren durante la capacitación, tal y como sugirió Liu en 2007 (Liu, 2007). También es posible que la actividad de los PAs en el fluido oviductal pudiera jugar un papel en el mantenimiento de la fluidez del medio (Vassalli *et al.*, 1991), facilitando el desplazamiento de los espermatozoides y el encuentro de los gametos.

Otro aspecto que debemos tener en cuenta al intentar entender cómo podría afectar el sistema PLG-PLA en el oviducto a los espermatozoides es la capacidad de las células epiteliales del oviducto para secretar inhibidores de los activadores, concretamente PAI-1 (Gabler *et al.*, 2001; Kouba *et al.*, 2000a; Kouba *et al.*, 2000b; Tsantariotou *et al.*, 2005), como ya hemos comentado. Kouba *et al.* (Kouba *et al.*, 2000a) demostraron que las células epiteliales del istmo oviductal contienen gránulos secretores de PAI-1 y que la concentración de dicho inhibidor en la ampolla es muy baja. Además, se sabe que la síntesis de PAI-1 es regulada al alza por la progesterona, mientras que los estrógenos antagonizan dicho efecto (Schatz y Lockwood, 1993). De esto se deduce que durante la fase de predominio estrogénico, cuando los espermatozoides llegan al istmo, predomina la actividad de los PAs frente a PAI-1, pero que tras la ovulación, cuando los espermatozoides deben abandonar el reservorio y llegar a la ampolla, la expresión de PAI-1 comienza a aumentar. Es decir, la actividad proteolítica del sistema PLG-PLA se ve reducida cuando el número de espermatozoides capacitados, libres en el fluido oviductal nadando hacia la ampolla, aumenta.

El aumento de PAI-1 también se ha relacionado con la prevención de la implantación y adhesión prematura del cigoto-embrión al oviducto y con la protección de la ZP frente a la digestión proteolítica (Kouba *et al.*, 2000b), pero en nuestras condiciones experimentales no es relevante.

Todas las posibles funciones del sistema PLG-PLA en el oviducto que acabamos de comentar no contribuyen a aclarar el mecanismo que estamos intentando describir, mediante el cual este sistema disminuye la fecundación y la unión espermatozoide-ZP. Por este motivo, diseñamos el experimento 8, en el que pretendimos averiguar si

realmente la PLA evita que los espermatozoides se unan a la ZP, modificándola de alguna manera antes de la interacción (por ejemplo eliminando sitios de unión) o si lo que hace es que, una vez que se han unido, la PLA los “desune” cortando los enlaces mediante los cuales se ha producido la unión.

Esta última posibilidad se nos ocurrió intentando comprender la razón por la que aparecían diferencias significativas en el parámetro “número medio de espermatozoides por ZP” entre grupos experimentales a los que se había añadido la misma cantidad de PLG con diferencias temporales entre sí de 30 minutos (experimento 1). Por nuestra experiencia previa sabíamos que tras 5-10 minutos de contacto, el número de espermatozoides unido a la ZP, al menos en la especie porcina, es ya muy elevado, y en esa situación, si la PLA evitaba las uniones, lo lógico habría sido esperar un menor número de espermatozoides adheridos en el grupo en el que ya estaba presente el PLG 30 minutos antes de añadir los espermatozoides, y no en el grupo en el que el PLG se añadió 30 minutos después que los espermatozoides.

Partiendo de la base de que la velocidad de la reacción de activación de PLG a PLA en ambos casos debería ser la misma, la segunda de las opciones (una vez que se han unido los espermatozoides a la ZP, la PLA los “desune” cortando de algún modo los enlaces mediante los cuales se ha producido la unión) parecía más probable y, de hecho, se ajustaba mejor a los razonamientos que hemos expuesto en la discusión de los experimentos 1 a 3.

Los resultados fueron concluyentes. Utilizando ZPs bovinas y porcinas para evitar la presencia de activadores o inhibidores procedentes del ovocito y eliminar por tanto factores que pudieran interferir con los resultados, los datos del experimento 8 demostraron que, efectivamente, tanto en la especie bovina como en la porcina, las ZPs que a los 15 minutos ya tenían adheridos un número elevado de espermatozoides (proporcional a lo característico para cada especie en nuestras condiciones experimentales) los perdían parcialmente como consecuencia de la adición de PLA. De hecho, mientras que en las ZPs del grupo control este número no variaba a las 3 horas de la inseminación en ninguna de las dos especies, y sólo disminuía levemente a las 24 horas en la especie bovina, sí se observaba una drástica disminución tanto a las 3 como a las 24 horas en presencia de PLA.

Estos resultados sí que explicaban, al menos parcialmente, el mecanismo de acción del sistema PLG-PLA en la fecundación y ofrecían un componente novedoso no

propuesto hasta ahora en la literatura: la acción de la PLA generada por la activación del PLG mediante activadores procedentes de los gametos provocaba una liberación de los espermatozoides unidos a la ZP, contribuyendo de este modo al control de la polispermia. Para corroborar esta propuesta más directamente, diseñamos el último experimento del presente trabajo, el experimento 9, en el que pretendimos observar en tiempo real este efecto de la PLA sobre los espermatozoides unidos a la ZP. Los videos obtenidos demostraron que, efectivamente, la PLA liberaba los espermatozoides unidos a la ZP, ya que gametos que estaban firmemente unidos a la zona se desprendían fácilmente de la misma tras un leve toque de la pipeta de microinyección si se añadía PLA en las proximidades. Este mecanismo de acción de la PLA era consistente con todos los datos obtenidos en los experimentos anteriores, y nos permitió proponer un modelo biológico en dos etapas que describimos a continuación.

#### **7.4. Propuesta de modelos biológicos compatibles con los resultados obtenidos**

En una fase preliminar, anterior a la que hemos analizado en nuestro estudio, la presencia de los diferentes componentes del sistema PLG-PLA en el oviducto podría tener diferentes roles que contribuirían colateralmente al éxito de la fecundación, como ya hemos explicado, pero que no han sido el objetivo de nuestra investigación. Entre ellos, se incluiría su posible participación en la capacitación, en la disminución de la viscosidad del fluido oviductal, o en la interacción espermatozoide-célula epitelial.

En lo que ya denominaríamos etapa 1 de nuestro estudio, analizaríamos la situación desde la parte más externa de la ZP, la de mayor diámetro, cuando el espermatozoide la alcanza y se adhiere a ella. En este momento, algunos de nuestros resultados contribuirían a describir el mecanismo de acción del sistema PLG-PLA en la fecundación.

Apoyándonos en nuestros datos y los descritos en la bibliografía, proponemos que la generación de PLA, mediante los activadores presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides y el PLG que hemos comprobado que se une a la ZP, provocaría una proteólisis focalizada que contribuiría a la degradación controlada de la ZP y facilitaría el paso de los espermatozoides a través de la misma. Durante este paso, los espermatozoides experimentarían la reacción acrosómica y en consecuencia perderían los activadores de su membrana plasmática en la región de la cabeza. Podríamos decir, por tanto, que en esta fase el sistema PLG-PLA tendría una función “facilitadora” del proceso de fecundación y dependería tan solo del PLG ya presente en la ZP cuando el

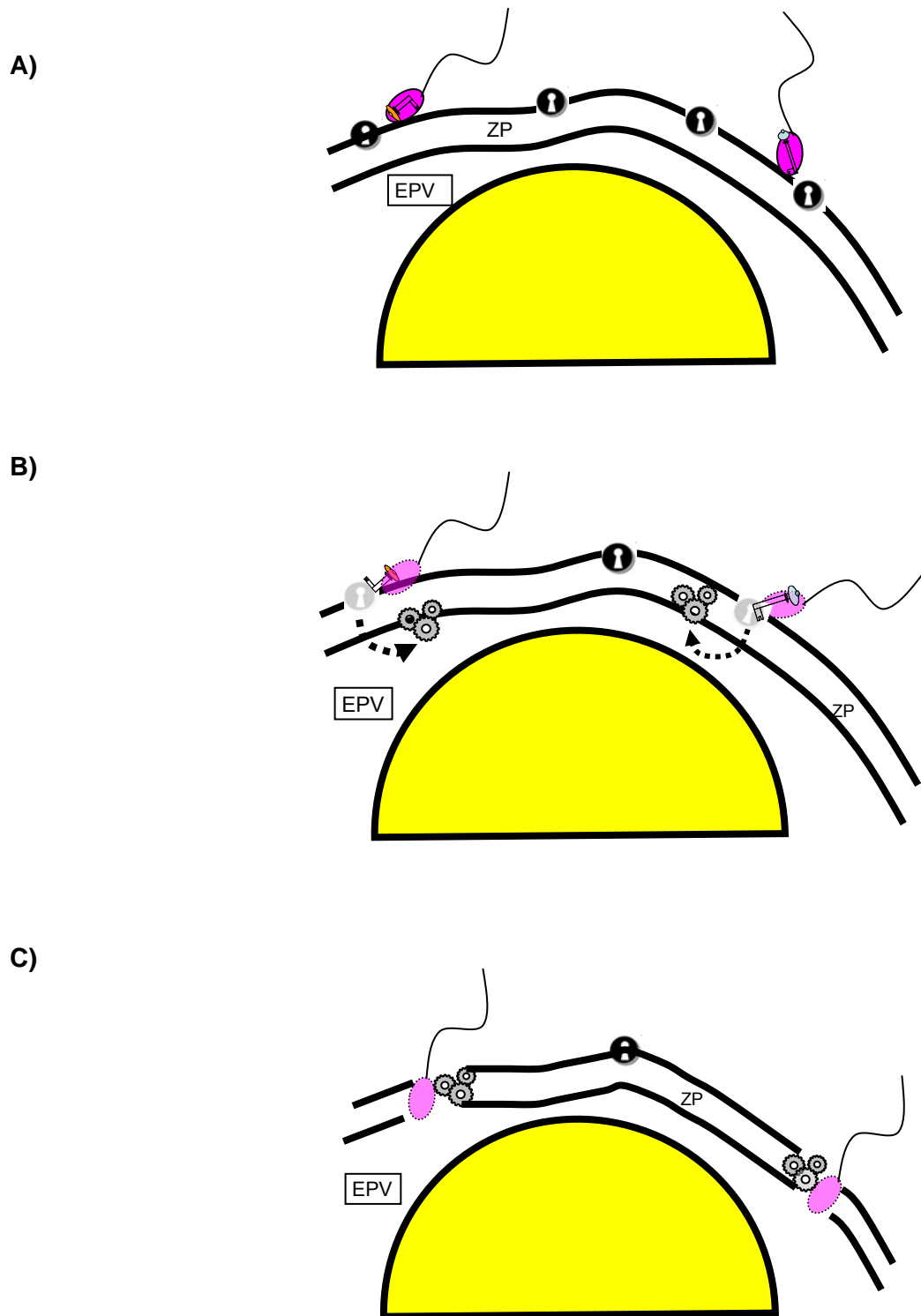
ovocito ovula, que se correspondería con el que hemos observado en las imágenes de inmunofluorescencia del experimento 4.1. Este modelo se representa gráficamente en la figura 7.3.

En la etapa 2, cuando el espermatozoide ya reaccionado atraviesa el espacio perivitelino (EPV) y alcanza la membrana plasmática del ovocito, ha perdido los PAs. El ovocito maduro, por su parte, libera al medio lentamente los activadores que contiene (al menos tPA según la bibliografía, pero también uPA según nuestros datos) y su capacidad de generación de PLA existe pero ocurre a un ritmo muy bajo, suficiente para mantener una proteólisis moderada y equilibrada en el espacio extracelular y una fluidez adecuada del fluido en el EPV.

Sin embargo, cuando el espermatozoide reaccionado se une al oolema y provoca la activación del ovocito, se produce una rápida liberación de los PAs desde el interior del ovocito, que activan todo el PLG del oolema. La PLA generada a este nivel difunde a través del espacio perivitelino hasta alcanzar la ZP junto con los PAs “en exceso”. El PLG de origen folicular en la ZP, ya consumido en la etapa anterior, ha sido reemplazado por PLG de origen oviductal y la PLA generada a este nivel ejerce ahora una proteólisis efectiva sobre los sitios de unión de los espermatozoides, desprendiéndolos de la ZP. En este caso, el sistema PLG-PLA contribuiría a la regulación de la polispermia. Este modelo se representa en la figura 7.4.

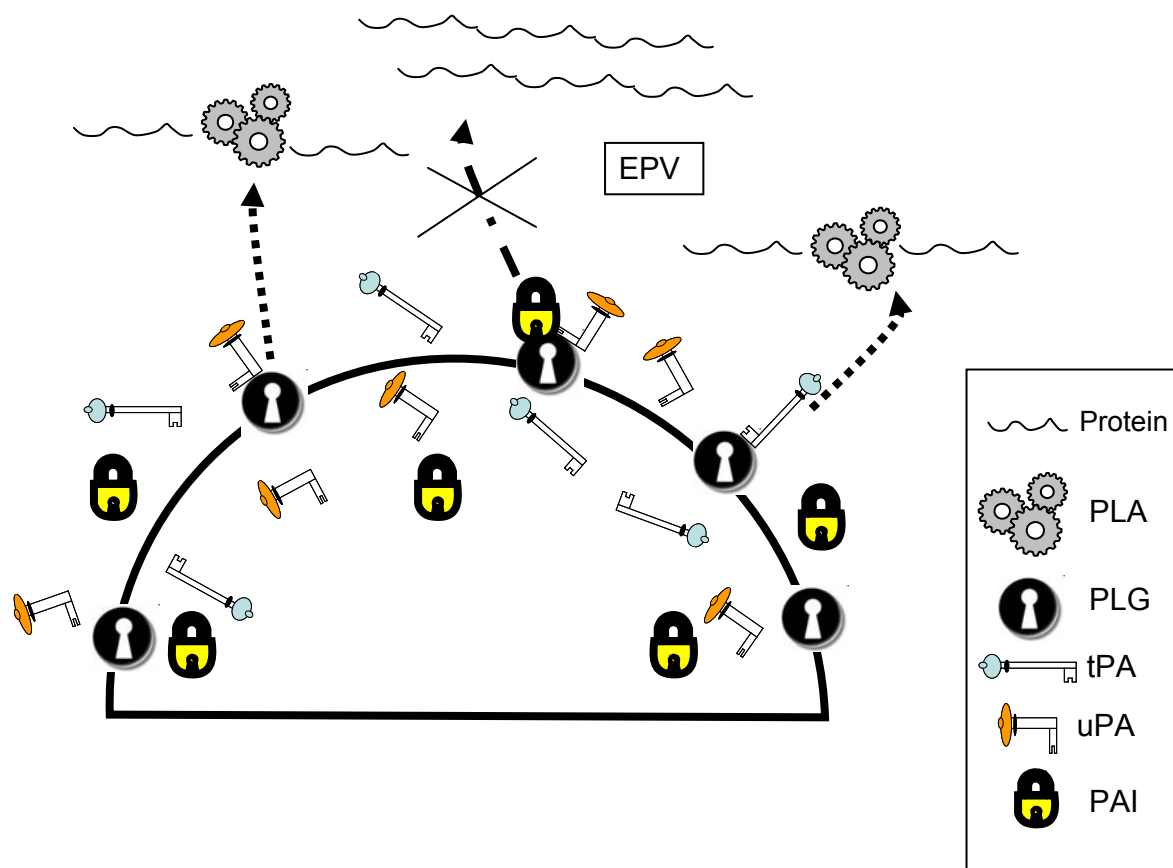


**Figura 7.3.** Etapa 1. Activación del sistema PLG-PLA en la ZP. **A)** Los espermatozoides contactan con la ZP. **B)** Al iniciarse la reacción acrosómica, se liberan los PAs, activando al PLG de la ZP. **C)** La PLA generada provoca microrregiones de proteólisis focalizada en la ZP que facilitan el paso de los espermatozoides.



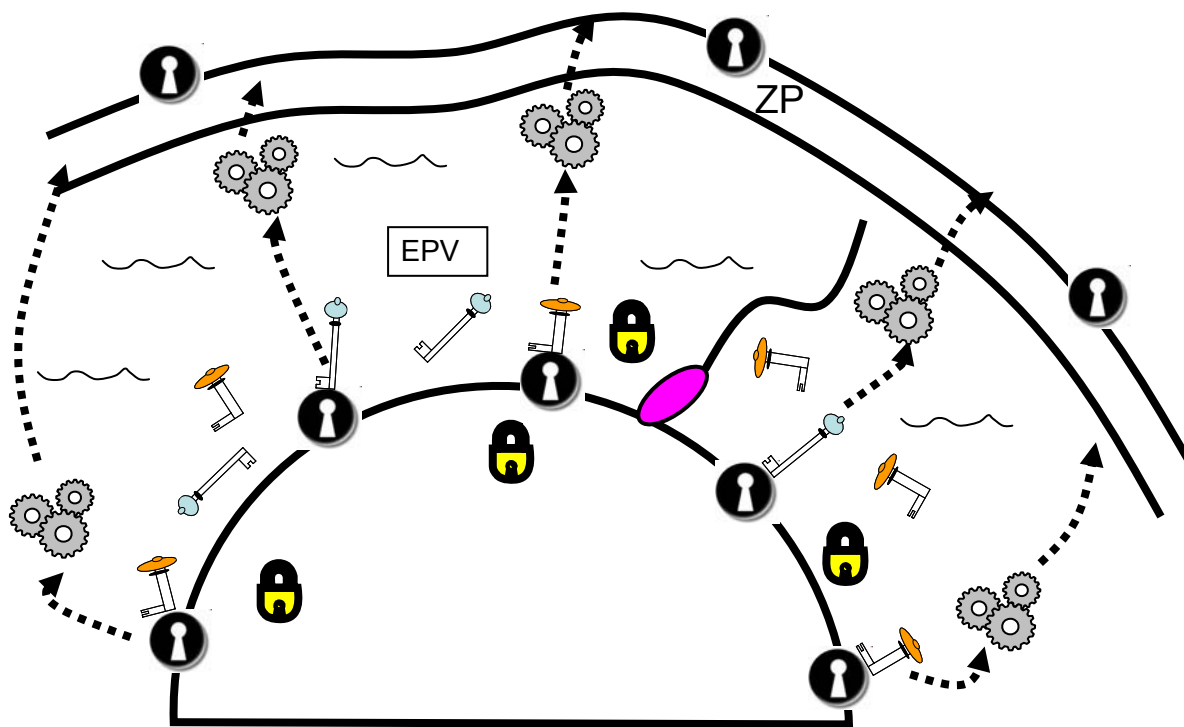
**Figura 7.4.** Etapa 2. Activación del sistema PLG-PLA en el oolema. **A)** El ovocito maduro, en el oviducto, presenta PLG fijado a sus sitios de unión en el oolema, y está en un proceso de secreción moderada y en equilibrio de tPA, uPA y PAI. De este modo, la generación local de PLA está controlada y provoca la proteólisis necesaria para mantener la fluidez del EPV.

A)



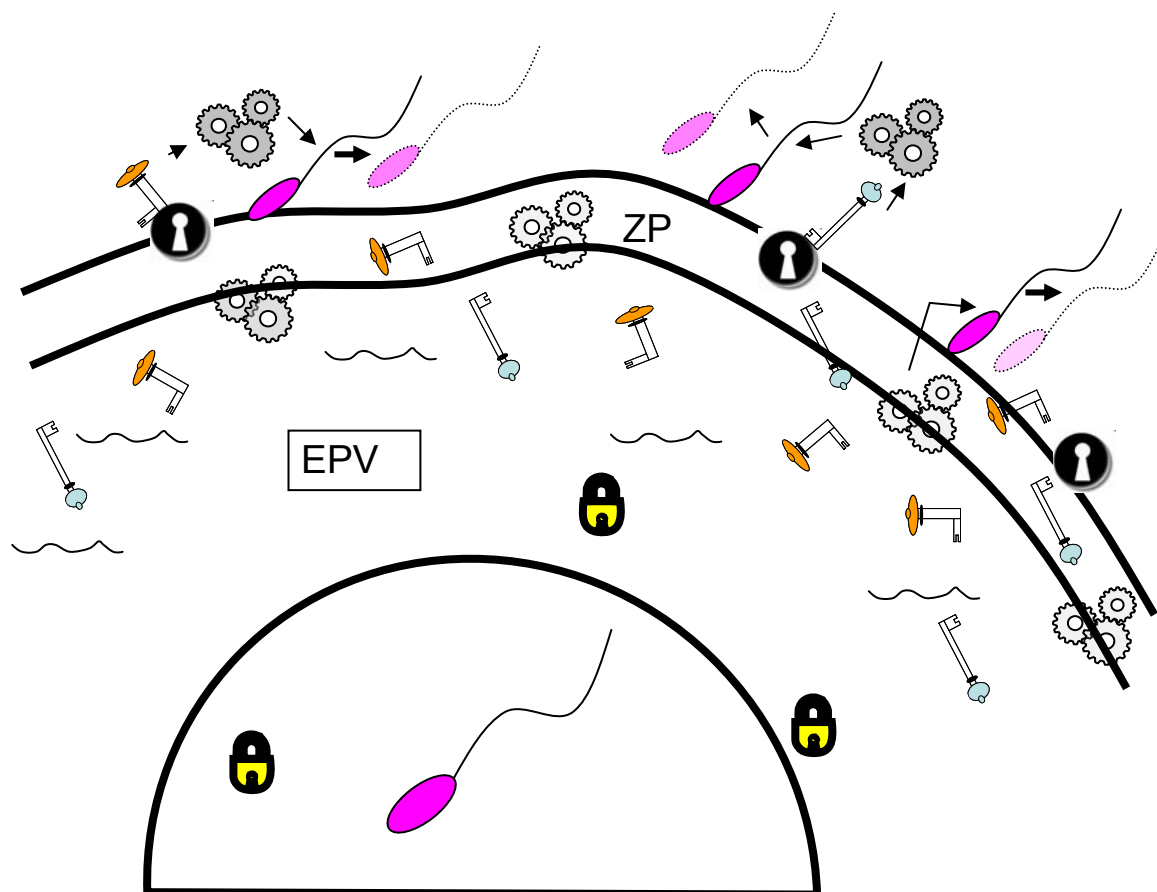
**Figura 7.4 (continuación).** Etapa 2. Activación del sistema PLG-PLA en el oolema. **B)** Con la llegada del espermatozoide, se produce una salida masiva de tPA y uPA que provocan la activación de todo el PLG unido al oolema y la producción de PLA, que difunde hacia la ZP.

**B)**



**Figura 7.4 (continuación).** Etapa 2. Activación del sistema PLG-PLA en el oolema. **C)** Los activadores liberados en exceso también difunden hacia la ZP, activando al PLG en esta región. La PLA generada provoca el desprendimiento de los espermatozoides unidos a la ZP.

c)



# Conclusiones

## Conclusiones

## 8. CONCLUSIONES

1. El plasminógeno, añadido al medio de cultivo durante la fecundación *in vitro* en concentraciones próximas a la detectada en plasma humano, disminuye la penetración y el número medio de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida en las especies bovina y porcina. Este efecto es dosis-dependiente y tiempo-dependiente.
2. La plasmina, añadida al medio de fecundación *in vitro*, tiene un efecto similar al observado con el plasminógeno, más evidente en la especie porcina que en la bovina.
3. La zona pelúcida de los ovocitos bovinos y porcinos madurados *in vitro* es positiva al marcaje con un anticuerpo anti-plasminógeno. Tras la fecundación, este marcaje disminuye en intensidad quedando asociado a los espermatozoides unidos a la zona pelúcida.
4. La región del oolema de los ovocitos bovinos y porcinos madurados *in vitro* es positiva al marcaje con un anticuerpo anti-plasminógeno. Dicho marcaje desaparece completamente tras la fecundación *in vitro*.
5. Los ovocitos bovinos y porcinos madurados *in vitro* son positivos al marcaje con los anticuerpos anti-activadores del plasminógeno (tipo tisular y tipo uroquinasa) en la zona pelúcida. Tras la fecundación este marcaje disminuye en intensidad en comparación con los ovocitos no fecundados.
6. Los ovocitos bovinos y porcinos madurados *in vitro* son positivos al marcaje con los anticuerpos anti-activadores del plasminógeno (tipo tisular y tipo uroquinasa) en la región del oolema. Tras la fecundación, dicho marcaje desaparece completamente de los ovocitos bovinos y parcialmente de los porcinos.
7. La incubación de los ovocitos bovinos y porcinos en un medio de cultivo en presencia de plasminógeno o de plasmina no tiene ningún efecto sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión con pronasa.
8. La incubación de espermatozoides de toro y de verraco en un medio de fecundación *in vitro* durante 30 minutos en presencia de plasminógeno no afecta a los porcentajes de viabilidad espermática ni al grado de desorden lipídico de las membranas en ninguna de

las dos especies, aunque disminuye el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados en la especie porcina.

**9.** La incubación de espermatozoides de toro en un medio de fecundación *in vitro* durante 30 minutos en presencia de plasmina aumenta la viabilidad, el grado de desorden lipídico de las membranas espermáticas y el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto. En la especie porcina no tiene ningún efecto significativo.

**10.** La presencia de plasmina en el medio de cultivo, añadida 30 minutos después del inicio del contacto entre espermatozoides y zonas pelúcidas aisladas, provoca una marcada disminución en el número de espermatozoides que se habían unido a las zonas durante los primeros 15 minutos de contacto en las dos especies estudiadas, tanto a las 3 horas del inicio del contacto como a las 24 horas.

**11.** La plasmina, inyectada en las proximidades del lugar de unión espermatozoide-zona pelúcida, provoca la liberación de los espermatozoides previamente adheridos.

Conclusions  
**Conclusions**



## 9. CONCLUSIONS

1. Plasminogen, added to the culture medium during *in vitro* fertilization at concentrations close to that detected in human plasma, decreases the penetration and the average number of sperm attached to the zona pellucida in the bovine and swine species. This effect is dose-dependent and time-dependent.
2. Plasmin, added to the *in vitro* fertilization medium, has an effect similar to that observed with plasminogen, most evident in pigs than cattle.
3. The zona pellucida of bovine and porcine oocytes matured *in vitro* shows positive labeling with anti-plasminogen antibody. After fertilization, the staining intensity decreases, remaining associated with spermatozoa bound to the zona pellucida.
4. Oolema region of bovine and porcine oocytes matured *in vitro* shows positive labeling with anti-plasminogen antibody. This staining disappears completely after *in vitro* fertilization.
5. Bovine and porcine oocytes matured *in vitro* were positive for staining with anti-plasminogen activators (tissue type and urokinase-type) in the zona pellucida. After fertilization this staining decreased in intensity compared with unfertilized oocytes.
6. Bovine and porcine oocytes matured *in vitro* are positive for staining with anti-plasminogen activators (tissue type and urokinase-type) in the region of oolema. After fertilization, the staining disappears completely in the bovine oocytes and partially in the porcine oocytes
7. Incubation of bovine and porcine oocytes in culture medium in the presence of plasminogen or plasmin has no effect on the resistance of the zona pellucida to digestion with pronase.
8. Incubation of bull and boar spermatozoa in an *in vitro* fertilization medium for 30 minutes in the presence of plasminogen does not affect the percentages of sperm viability or the degree of lipid disorder in sperm membranes in either species, but decreases the percentage of live spermatozoa in swine.

9. Incubation of bull sperm in *in vitro* fertilization medium for 30 min with plasmin increases the viability, degree of lipid disorder in sperm membranes and percentage of sperm with intact acrosome. In swine has no significant effect.
  
10. The presence of plasmin in the culture medium, added 30 minutes after the beginning of contact between spermatozoa and isolated zonae, causes a marked decrease in the number of sperm that were already attached to the zona in two species studied, both at 3 hours after initiation of the sperm-zona pellucida contact and after 24 hours.
  
11. Plasmin injected into the vicinity of the sperm-zona pellucida binding sites, triggers the release of previously attached sperm.

# Abreviaturas

## Abreviaturas

## 10. ABREVIATURAS

- $\alpha_1$ -AT:**  $\alpha_1$ -antitripsina
- $\alpha_2$ -APLA:**  $\alpha_2$ -antiplasmina
- $\alpha_2$ -M:**  $\alpha_2$ -macroglobulina
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- BSA:** albúmina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)
- BTS:** medio *Beltsville Thawing Solution*
- CA:** capacitación espermática
- Cetab:** bromuro de hexadecil-trimetilamonio
- CCO:** células del *cumulus oophorus*
- COCs:** complejos *cumulus*-ovocito
- dbAMPc:** dibutilil adenosín monofosfato cíclico
- DMSO:** dimetil sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)
- eCG:** gonadotropina sérica de yegua gestante (*Equine Chorionic Gonadotropin*)
- ECM:** matriz extracelular (*Extracellular Matrix*)
- EPV:** espacio perivitelino
- Esp/Ovocito:** número medio de espermatozoides por ovocito penetrado
- Esp/ZP:** número medio de espermatozoides adheridos a la ZP del ovocito
- FDF:** factor de crecimiento fibroblasto
- FDP:** productos de degradación de la fibrina (*Fibrin Degradation Products*)
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isotiocyanate*)
- FIV:** fecundación *in vitro*
- FSH:** hormona folículo estimulante (*Follicle Stimulating Hormone*)
- GCs:** gránulos corticales
- GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas (*Gonadotropin Releasing Hormone*)
- HGF/SF:** factor de crecimiento hepatocitario/factor de dispersión (*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*)
- hCG:** gonadotropina coriónica humana (*Human Chorionic Gonadotropin*)
- HMW-uPA:** activador del plasminógeno tipo uroquinasa de alto peso molecular (*High Molecular Weight of Urokinase Plasminogen Activator*)
- IP:** yoduro de propidio
- kDa:** kilodalton
- LCA:** lectina de *Lens culinaris agglutinin*
- LH:** hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone*)

**LMW-uPA:** activador del plasminógeno tipo uroquinasa de bajo peso molecular (*Low Molecular Weight of uPA*)

**M540:** merocianina 540

**MII:** estadio nuclear de metafase II

**MIV:** maduración *in vitro*

**MMP:** metaloproteinasas de la matriz extracelular (*Matrix Metalloproteinasa*)

**MPF:** factor promotor de la maduración (*Maturation Promoting Factor*)

**MPGF:** factor de crecimiento del pronúcleo masculino (*Male Pronucleus Growth Factor*)

**Nº:** número total

**NCSU-37:** medio *North Carolina State University-37*

**OCM:** medio de recogida de ovocitos bovinos (*Oocyte Collection Medium*)

**OMM:** medio de maduración de ovocitos bovinos (*Oocyte Maturation Medium*)

**OVPG:** glicoproteínas específicas del oviducto (*Oviductal Glycoproteins*)

**PAs:** activadores del plasminógeno (*Plasminogen Activator*)

**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

**PAIs:** inhibidores de los activadores del plasminógeno (*Plasminogen Activator Inhibitor*)

**PAI-1:** inhibidor de los activadores de plasminógeno tipo 1

**PAI-2:** inhibidor de los activadores de plasminógeno tipo 2

**PAI-3:** inhibidor de los activadores de plasminógeno tipo 3

**PBSD:** tampón fosfato salino de Dulbecco (*Phosphate Buffered Saline*) suplementado con PVA (1 mg/ml) y rojo fenol (0.005 mg/l)

**PI:** yoduro de propidio

**PIFF:** fluido folicular porcino (*Porcine Follicular Fluid*)

**PHE:** penicilamina hipotaurina epinefrina

**PLA:** plasmina

**PLG:** plasminógeno

**PLGR:** receptor del plasminógeno (*Plasminogen Receptor*)

**PNA:** lectina de *Arachis hypogea* (*Peanut Agglutinin*)

**%PNM:** porcentaje de formación de pronúcleo masculino

**Pro-MMP:** pro-metaloproteinasas de la matriz extracelular (*Pro-Matrix Metalloproteinasa*)

**Pro-uPA/tc-uPA:** pro-activador del plasminógeno tipo uroquinasa / cadena doble del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Pro Urokinase Plasminogen Activator / Two Chains Urokinase Plasminogen Activator*)

**P/V:** peso/volumen

**PVA:** alcohol de polivinilo (*Polyvinyl Alcohol*)

**RA:** reacción acrosómica

**SAK:** estafilocinasa

**sc-tPA:** cadena simple de activador del plasminógeno tipo tisular (*Single Chain Tissue Plasminogen Activator*)

**sc-uPA:** cadena simple de activador del plasminógeno tipo tisular (*Single Chain Urokinase Plasminogen Activator*)

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**SFB:** suero fetal bovino

**SNC:** sistema nervioso central

**SSF:** solución salina fisiológica

**STK:** estreptoquinasa

**TALP:** medio de Tyrodes con albúmina, lactato y piruvato (*Tyrode Albumin Lactate Pyruvate*)

**TALPb:** medio TALP suplementado para FIV de ovocitos bovinos

**TALPp:** medio TALP suplementado para FIV de ovocitos porcinos

**TCM-199:** medio de cultivo 199 (*Tissue Culture Medium-199*)

**tc-tPA:** cadena doble del activador del plasminógeno tisular (*Two Chains Tissue Plasminogen Activator*)

**tc-uPA:** cadena doble del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Two Chains Urokinase Plasminogen Activator*)

**TFG- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante (*Transforming Growth Factor Beta*)

**TIMP:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*)

**tPA:** activador del plasminógeno tipo tisular (*Tissue Plasminogen Activator*)

**tPAR:** receptor del activador del plasminógeno tipo tisular (*Tissue Plasminogen Activator Receptor*)

**TRICT:** isotiocianato de tetrametil rodamina

**uPA:** activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Urokinase Plasminogen Activator*)

**uPAR:** receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Urokinase Plasminogen Activator Receptor*)

**UUT:** unión útero-tubárica

**VG:** vesícula germinal

**v/v:** volumen/volumen

**w/v:** peso/volumen (*Weigth/Volumen*)

**YP1:** Yo-Pro 1

**ZP:** zona pelúcida

# Bibliografía

## **Bibliografía**

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott A, Ducibella T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci* 6:792-806.
- Abeydeera LR. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 57:256-273.
- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G, Har-Vardi I. 2004. Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fertil Steril* 81:780-785.
- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G, Har-Vardi I. 2005. Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed in vivo and in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 10:3-7.
- Agnelli G. 1993. The pharmacological basis of thrombolytic treatment. In: Agnelli G (ed). *Thrombolysis yearbook*. Amsterdam. Excerpta Medica 25-51.
- Aguilar S. 2004. Tissue plasminogen activator in murine pancreas cancer: selective expression in ductal tumors and contribution to cancer progression. *Am J Pathol* 165:1129-1139.
- Albrechtsen O. 1957. The fibrinolytic activity of human tissues. *Br J Haematol* 3:284-291.
- Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. 2005. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol Reprod Dev* 72:281-290.
- Amari S, Yonezawa N, Mitsui S, Katsumata T, Hamano S, Kuwayama M, Hashimoto Y, Suzuki A, Takeda Y, Nakano M. 2001. Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 59:221-226.
- Anderson E. 1968. Oocyte differentiation in the sea urchin, *Arbacia punctulata*, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. *J Cell Biol* 37:514-539.
- Andreasen P, Kjøller L, Christensen L, Duffy M. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72:1-22.
- Andronicos N, Chen E, Baik N, Bai H, Parmer C, Kiosses W, Kamps M, Yates J R, Parmer R, Miles L. 2009. Proteomics-based discovery of a novel, structurally unique, and developmentally regulated plasminogen receptor, Plg-RKT, a major regulator of cell surface plasminogen activation. *Blood* 115:1319-1330.
- Appella E, Robinson E, Ullrich S, Stoppelli M, Corti A, Cassani G, Blasi F. 1987. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 262:4437-4440.
- Astedt B, Holmberg L. 1976. Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 261:595-597.
- Au Y, Dobrowolska G, Morris D, Clowes A. 1994. Heparin decreases activator protein-1 binding to DNA in part by posttranslational modification of Jun B. *Circ Res* 75:15-22.



- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B* 4:581-596.
- Austin CR. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170:326.
- Austin CR. 1961. Fertilization of mammalian eggs in vitro. *Int Rev Cytol* 12:337-359.
- Austin CR. 1974. Principles of fertilization. *Proc R Soc Med* 67:925-927.
- Austin CR, Braden AW. 1953. An investigation of polyspermy in the rat and rabbit. *Aust J Biol Sci* 6:674-692.
- Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. 2010. Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* doi:10.1093/molehr/gaq056.
- Axelrod H. 1985. Altered trophoblast functions in implantation-defective mouse embryos. *Dev Biol* 108:185-190.
- Bachmann F. 1995. The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects. *Thromb Haemost* 74:172-179.
- Baillie H, Pacey A, Warren M, Scudamore I, Barratt C. 1997. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod* 12:1985-1992.
- Barros C, Yanagimachi R. 1971. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233:268-269.
- Bartlett SE, Menino AR, Jr. 1993. Partial characterization of the plasminogen activator produced by ovine embryos in vitro. *Biol Reprod* 49:381-386.
- Bedford JM. 1969. Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 8:19.
- Bedford JM. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2:128-158.
- Beers WH. 1975. Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6:379-386.
- Beers WH, Strickland S, Reich E. 1975. Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell* 6:387-394.
- Beers WH, Strickland S. 1978. A cell culture assay for follicle-stimulating hormone. *J Biol Chem* 253:3877-3881.
- Behrendt N, Rønne E, Ploug M, Petri T, Løber D, Nielsen L, Schleuning W, Blasi F, Appella E, Danø K. 1990. The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J Biol Chem* 265:6453-6460.
- Benau D, Storey B. 1987. Characterization of the mouse sperm plasma membrane zona-binding site sensitive to trypsin inhibitors. *Biol Reprod* 36:282-292.
- Benau D, Storey B. 1988. Relationship between two types of mouse sperm surface sites that mediate binding of sperm to the zona pellucida. *Biol Reprod* 39:235-244.

- Berg DA, Menino AR, Jr. 1992. Bovine embryos produce a urokinase-type plasminogen activator. *Mol Reprod Dev* 31:14-19.
- Berglund L, Andersen MD, Petersen TE. 1995. Cloning and characterization of the bovine plasminogen cDNA. *Int Dairy J* 5:593-603.
- Betteridge K, Mitchell D. 1974. Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J Reprod Fertil* 39:145-148.
- Bicsak TA, Hsueh AJ. 1989. Rat oocyte tissue plasminogen activator is a catalytically efficient enzyme in the absence of fibrin. Endogenous potentiation of enzyme activity. *J Biol Chem* 264:630-634.
- Bicsak TA, Cajander SB, Peng XR, Ny T, LaPolt PS, Lu JK, Kristensen P, Tsafiriri A, Hsueh AJ. 1989a. Tissue-type plasminogen activator in rat oocytes: expression during the periovulatory period, after fertilization, and during follicular atresia. *Endocrinology* 124:187-194.
- Bicsak TA, Hekman CM, Hsueh AJ. 1989b. Neuroendocrine regulation of oocyte tissue plasminogen activator. *Methods Enzymol* 168:422-430.
- Binor Z, Sokoloski J, Wolf D. 1982. Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *J Exp Zool* 222:187-193.
- Binder B, Mihaly J, Prager G. 2007. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 97:336-342.
- Binor Z, Sokoloski J, Wolf D. 1982. Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *J Exp Zool* 222:187-193.
- Blasi F, Vassalli J, Danø K. 1987. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol* 104:801-804.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980a. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873-882.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980b. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 76:185-202.
- Blobel C, Wolfsberg T, Turck C, Myles D, Primakoff P, White J. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356:248-252.
- Bode V, Dziadek M. 1979. Plasminogen activator secretion during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 73:272-289.
- Borisov O, Field M, Ling V, Harris R. 2009. Characterization of oligosaccharides in recombinant tissue plasminogen activator produced in Chinese hamster ovary cells: two decades of analytical technology development. *Anal Chem* 81:9744-9754.
- Brackett BG. 1985. In vitro oocyte maturation and fertilization. *J Anim Sci* 61:14-24.
- Braden AW, Astin CR, David HA. 1954. The reaction of zona pellucida to sperm penetration. *Aust J Biol Sci* 7:391-409.

- Broermann D, Xie S, Nephew K, Pope W. 1989. Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *J Anim Sci* 67:1324-1329.
- Brown C, Cheng W. 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 92:183-191.
- Bruse C, Bergqvist A, Carlström K, Fianu-Jonasson A, Lecander I, Astedt B. 1998. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril* 70:821-826.
- Brüssow K, Rátky J, Rodriguez-Martinez H. 2008. Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reprod Domest Anim* 43:245-251.
- Buhi WC. 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123:355-362.
- Buhi WC, Vallet JL, Bazer FW. 1989. De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *The J Exp Zool* 252:79-88.
- Buhi WC, O'Brien B, Alvarez IM, Erdos G, Dubois D. 1993. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod* 48:1274-1283.
- Buhi WC, Alvarez IM, Choi I, Cleaver BD, Simmen FA. 1996. Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* 55:1305-1314.
- Bulens F, Ibañez-Tallon I, Van Acker P, De Vriese A, Nelles L, Belayew A, Collen D. 1995. Retinoic acid induction of human tissue-type plasminogen activator gene expression via a direct repeat element (DR5) located at -7 kilobases. *J Biol Chem* 270:7167-7175.
- Bulens F, Merchiers P, Ibañez-Tallon I, De Vriese A, Nelles L, Claessens F, Belayew A, Collen D. 1997. Identification of a multihormone responsive enhancer far upstream from the human tissue-type plasminogen activator gene. *J Biol Chem* 272:663-671.
- Cajander S, Hugin M, Kristensen P, Hsueh A. 1989. Immunohistochemical localization of tissue-type plasminogen activator in ovaries before and after induced and spontaneous ovulation in the rat. *Cell Tissue Res* 257:1-8.
- Canipari R. 1994. Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 2:343-345.
- Canipari R, Strickland S. 1985. Plasminogen activator in the rat ovary. Production and gonadotropin regulation of the enzyme in granulosa and thecal cells. *J Biol Chem* 260:5121-5125.
- Canipari R, Strickland S. 1986. Studies on the hormonal regulation of plasminogen activator production in the rat ovary. *Endocrinology* 118:1652-1659.

- Canipari R, O'Connell M, Meyer G, Strickland S. 1987. Mouse ovarian granulosa cells produce urokinase-type plasminogen activator, whereas the corresponding rat cells produce tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol* 105:977-981.
- Canipari R, Epifano O, Siracusa G, Salustri A. 1995. Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Dev Biol* 167:371-378.
- Cannon MJ, Menino AR, Jr. 1998. Changes in the bovine zona pellucida induced by plasmin or embryonic plasminogen activator. *Mol Reprod Dev* 51:330-338.
- Carrasco L, Coy P, Avilés M, Gadea J, Romar R. 2008a. Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 20:808-817.
- Carrasco L, Romar R, Avilés M, Gadea J, Coy P. 2008b. Determination of glycosidase activity in porcine oviducal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction* 136:833-842.
- Carroll PM, Richards WG, Darrow AL, Wells JM, Strickland S. 1993. Preimplantation mouse embryos express a cell surface receptor for tissue-plasminogen activator. *Development* 119:191-198.
- Casslén B, Urano S, Lecander I, Ny T. 1992. Plasminogen activators in the human endometrium, cellular origin and hormonal regulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 3:133-138.
- Casslén B, Nordengren J, Gustavsson B, Nilbert M, Lund L. 1995. Progesterone stimulates degradation of urokinase plasminogen activator (u-PA) in endometrial stromal cells by increasing its inhibitor and surface expression of the u-PA receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2776-2784.
- Cesarman G, Guevara C, Hajjar K. 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem* 269:21198-21203.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168:697-698.
- Chang MC. 1957. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature* 179:258-259.
- Chapman HA. 1997. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9:714-724.
- Chen L, Mao S, McLean L, Powers R, Larsen W. 1994. Proteins of the inter-alpha-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J Biol Chem* 269:28282-28287.
- Chen X, Li Q, Zhang S, Han Z, Zhao R, Wu S, Huang J. 2007. Effects of ovarian cortex cell co-culture during in vitro maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* 99:306-316.
- Chen Y, Tan W, Cheng J. 2006. Sequence for plasminogen in *Bos taurus*. Pubmed (protein data base). Accession number CAA55939.

- Cho WK, Stern S, Biggers JD. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 187:383-386.
- Clark GF, Dell A. 2006. Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* 281:13853-13856.
- Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 52:198-236.
- Colgin D, Murdoch W. 1997. Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. *Anim Reprod Sci* 47:197-204.
- Collen D. 1980. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost* 43:77-89.
- Collen D. 1987. Molecular mechanisms of fibrinolysis and their application to fibrin-specific thrombolytic therapy. *J Cell Biochem* 33:77-86.
- Collen D, Lijnen H. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78:3114-3124.
- Collen D, Lijnen H. 1995. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 74:167-171.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C, García E. 2002. Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction* 124:279-288.
- Coy P, Romar R, Payton R, McCann L, Saxton A, Edwards J. 2005. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction* 129:19-26.
- Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, Romar R, Grullón L, Matás C, Avilés M. 2008a. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15809-15814.
- Coy P, Grullón L, Cánovas S, Romar R, Matás C, Avilés M. 2008b. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 135:19-27.
- Coy P, Avilés M. 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc* 85:593-605.
- Coy P, Lloyd R, Romar R, Satake N, Matás C, Gadea J, Holt W. 2010. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. *Theriogenology* 74:632-642.
- Cran DG. 1985. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 74:237-245.
- Cran DG, Cheng WTK. 1985. Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. *Gamete Res* 11:311-319.

- D'Alessandris C, Canipari R, Di Giacomo M, Epifano O, Camaioni A, Siracusa G, Salustri A. 2001. Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. *Endocrinology* 142:3033-3040.
- Danø K, Andreasen P, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen L, Skriver L. 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44:139-266.
- Davis BK. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7560-7564.
- Dawson S, Henney A. 1992. The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis* 95:105-117.
- De Jonge C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11:205-214.
- Dean J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays* 26:29-38.
- Deits T, Farrance M, Kay E, Medill L, Turner E, Weidman P, Shapiro B. 1984. Purification and properties of ovoperoxidase, the enzyme responsible for hardening the fertilization membrane of the sea urchin egg. *J Biol Chem* 259:13525-13533.
- Dekel N, Kraicer P. 1978. Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotrophins and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 102:1797-1802.
- Deng M, Kishikawa H, Yanagimachi R, Kopf G, Schultz R, Williams C. 2003. Chromatin-mediated cortical granule redistribution is responsible for the formation of the cortical granule-free domain in mouse eggs. *Dev Biol* 257:166-176.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267:10149-10155.
- Deutinger J, Kirchheimer J, Reinthaller A, Christ G, Tatra G, Binder B. 1988. Elevated tissue type plasminogen activator in human granulosa cells correlates with fertilizing capacity. *Hum Reprod* 3:597-599.
- Diaz H, Esponda P. 2004. Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote* 12:95-103.
- Dieleman SJ, Kruip TA, Fontijne P, de Jong WH, van der Weyden GC. 1983. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol* 97:31-42.
- Ding XF, Xiong CL. 2005. Effects of urokinase-type plasminogen activator on chemotactic responses of spermatozoa in vitro. *Zhonghua nan ke xue* 11:409-12, 418.
- Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA. 1997. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 56:861-869.

- Dow M, Bakke L, Cassar C, Peters M, Pursley J, Smith G. 2002. Gonadotrophin surge-induced upregulation of mRNA for plasminogen activator inhibitors 1 and 2 within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Reproduction* 123:711-719.
- Du Mesnil Du Boisson F, Dautier L. 1955. The ascent of the spermatozoa of boar in the genital tract of the sow in estrus. *C R Seances Soc Biol Fil* 149:76-79.
- Du Mesnil Du Buisson F, Manleon P, Locatello A, Mariana JC. 1970. Modification du moment et de l'étalement des ovulations après maîtrise de cycle sexual de la truie. *Colloque Ste Nat Etude Steril-Fertil L'inhibition de l'ovulation. Paris-Mason* 225-234.
- Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Aalberg J, Rangarajan S. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Developmental biology* 130:184-197.
- Ducibella T, Buetow J. 1994. Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol* 165:95-104.
- Ducibella T, Duffy P, Buetow J. 1994. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 50:467-473.
- Dyk A, Menino AJ. 1991. Electrophoretic characterization of the plasminogen activator produced by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 93:483-489.
- Edwards J, Hansen P. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol Reprod* 55:341-346.
- Eichenlaub-Ritter U, Chandley AC, Gosden RG. 1986. Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study. *Chromosoma* 94:337-345.
- Elder K, Dale B. 2000. *In vitro fertilization*. 2<sup>nd</sup> (ed). Cambridge, UK. Published by Cambridge University Press 1-310.
- Epifano O, Riminucci M, Manna C, Apa R, Greco E, Lanzone A, Stefanini M, Canipari R. 1994. In vitro production of plasminogen activator by human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 78:174-179.
- Eppig JJ. 1979. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J Exp Zool* 208:111-120.
- España F, Griffin J. 1989. Determination of functional and antigenic protein C inhibitor and its complexes with activated protein C in plasma by ELISA's. *Thromb Res* 55:671-682.
- España F, Berrettini M, Griffin J. 1989. Purification and characterization of plasma protein C inhibitor. *Thromb Res* 55:369-384.
- España F, Gilabert J, Estellés A, Romeu A, Aznar J, Cabo A. 1991. Functionally active protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) is secreted in seminal vesicles, occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate-specific antigen. *Thromb Res* 64:309-320.

- España F, Estellés A, Fernández P, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin J. 1993. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma. *Thromb Haemost* 70:989-994.
- España F, Sánchez-Cuenca J, Fernández P, Gilabert J, Romeu A, Estellés A, Royo M, Muller C. 1999. Inhibition of human sperm-zona-free hamster oocyte binding and penetration by protein C inhibitor. *Andrologia* 31:217-223.
- Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff D, Schleeff R. 1989. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 74:1332-1338.
- Evans J. 2009. Egg integrins: back in the game of mammalian fertilization. *ACS Chem Biol* 4:321-323.
- Falcone D, McCaffrey T, Haimovitz-Friedman A, Vergilio J, Nicholson A. 1993. Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. Role of plasminogen activation. *J Biol Chem* 268:11951-11958.
- Fazeli A, Affara NA, Hubank M, Holt WV. 2004. Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biol Reprod* 71:60-65.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60:879-886.
- Fazeli A, Elliott R, Duncan A, Moore A, Watson P, Holt W. 2003. In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. *Reproduction* 125:509-517.
- Fazleabas A, Bazer F, Roberts R. 1982. Purification and properties of a progesterone-induced plasmin/trypsin inhibitor from uterine secretions of pigs and its immunocytochemical localization in the pregnant uterus. *J Biol Chem* 257:6886-6897.
- Fazleabas AT, Geisert RD, Bazer FW, Roberts RM. 1983. Relationship between release of plasminogen activator and estrogen by blastocysts and secretion of plasmin inhibitor by uterine endometrium in the pregnant pig. *Biol Reprod* 29:225-238.
- Feng Q, Liu K, Hu Z, Zou R, Yang S, Liu Y. 1993. The possible involvement of tissue type plasminogen activator in luteolysis of rhesus monkey. *Hum Reprod* 8:1640-1644.
- Finlay T, Katz J, Kirsch L, Levitz M, Nathoo S, Seiler S. 1983. Estrogen-stimulated uptake of plasminogen by the mouse uterus. *Endocrinology* 112:856-861.
- Fisher P, Grant S. 1985. Effects of interferon on differentiation of normal and tumor cells. *Pharmacol Ther* 27:143-166.
- Fléchon J, Hunter R. 1981. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* 13:127-139.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469:197-235.



- Flowers WL, Esbenshade KL. 1993. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *J Reprod Fertil Suppl* 48:217-228.
- Foerder C, Shapiro B. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4214-4218.
- Foresta C, Rossato M, Mioni R, Zorzi M. 1992. Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 24:33-35.
- Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50:225-232.
- Foxcroft G, Hunter M. 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl* 33:1-19.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *J Reprod Dev* 51:37-46.
- Fraser LR, Dandekar PV. 1973. Fertilization of rabbit eggs in vitro without supplemental CO<sub>2</sub> in the atmosphere. *J Reprod Fertil* 33:159-161.
- Fredenburgh J, Nesheim M. 1992. Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. *J Biol Chem* 267:26150-26156.
- Fritz I, Karmally K. 1983. Hormonal influences on formation of plasminogen activator by cultured testis tubule segments at defined stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Can J Biochem Cell Biol* 61:553-560.
- Funahashi H, Day BN. 1993. Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fertil* 99:97-103.
- Funahashi H, Day BN. 1997. Advances in in vitro production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 52:271-283.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 57:49-53.
- Funahashi H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H. 2000. Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* 63:1437-1442.
- Funahashi H, Romar R. 2004. Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pretreatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. *Reproduction* 128:789-800.
- Gabler C, Killian GJ, Einspanier R. 2001. Differential expression of extracellular matrix components in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 122:121-130.
- Gaddum-Rosse P. 1985. Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* 174:347-356.

- Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. 2010. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* 329:216-219.
- Galantino-Homer H, Zeng W, Megee S, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I. 2006. Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol Reprod Dev* 73:638-650.
- Galway A, Lapolt P, Tsafirri A, Dargan C, Boime I, Hsueh A. 1990. Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 127:3023-3028.
- Gardner AJ, Evans JP. 2006. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev* 18:53-61.
- Gardner AJ, Williams CJ, Evans JP. 2007. Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and -independent regulation. *Reproduction* 133:383-393.
- Geiger M, Huber K, Wojta J, Stingl L, Espana F, Griffin J, Binder B. 1989. Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo. *Blood* 74:722-728.
- Geisert RD. 1999. Pigs In: *Encyclopedia of Reproduction*. Ed: E Knobil and JD Neil. San Diego, USA. Academic Press, 3:792-799.
- Genton C, Kruithof E, Schleuning W. 1987. Phorbol ester induces the biosynthesis of glycosylated and nonglycosylated plasminogen activator inhibitor 2 in high excess over urokinase-type plasminogen activator in human U-937 lymphoma cells. *J Cell Biol* 104:705-712.
- Georgiou AS, Snijders AP, Sostaric E, Aflatoonian R, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Wright PC, Fazeli A. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res.* 6:4656-4666.
- Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders AP, Wright PC, Moore HD, Fazeli A. 2005. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics* 4:1785-1796.
- Gliedt DW, Rosenkrans CF, Jr., Rorie RW, Munyon AL, Pierson JN, Miller GF, Rakes JM. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J Dairy Sci* 79:536-542.
- Golder J, Stephens R. 1983. Minactivin: a human monocyte product which specifically inactivates urokinase-type plasminogen activators. *Eur J Biochem* 136:517-522.
- Griffin JE, Ojeda SR. 1992. *Textbook of endocrine physiology*. Oxford, New York. Oxford University Press, 351.
- Grobner M, Menino AJ. 1994. Plasminogen activator production and enhanced development in medium containing plasminogen or plasmin by rabbit embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 101:467-475.
- Grøndahl-Hansen J, Lund L, Ralfkiaer E, Ottevanger V, Danø K. 1988. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest Dermatol* 90:790-795.

- Gross V, Wessel G, Florman H, Ducibella T. 2000. A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32-kilodalton protein in mouse eggs. *Biol Reprod* 63:575-581.
- Gualtieri R, Mollo V, Barbato V, Talevi R. 2010. Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium in vitro. *Theriogenology* 73:1037-1043.
- Gualtieri R, Mollo V, Duma G, Talevi R. 2009. Redox control of surface protein sulphhydryls in bovine spermatozoa reversibly modulates sperm adhesion to the oviductal epithelium and capacitation. *Reproduction* 138:33-43.
- Guérette P, Langlais J, Antaki P, Chapdelaine A, Roberts K. 1988. Activation of phospholipase A2 of human spermatozoa by proteases. *Gamete Res* 19:203-214.
- Gulyas BJ, Schmell ED. 1980. Ovoperoxidase activity in ionophore-treated mouse eggs. I. Electron microscopic localization. *Gamete Res* 3:267-277.
- Günzler W, Steffens G, Otting F, Kim S, Frankus E, Flohé L. 1982. The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of the A chain. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363:1155-1165.
- Gwathmey T, Ignatz G, Suarez S. 2003. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 69:809-815.
- Hafez ESE, Hafez B, Féher de la Torre G, Olvera Martínez E, Espinoza Villavicencio JL. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 4<sup>a</sup> ed. México, D. F.: McGraw-Hill Interamericana. XIII, 519.
- Hägglund A, Ny A, Liu K, Ny T. 1996. Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation. *Endocrinology* 137:5671-5677.
- Hajjar K. 1995. Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. *Thromb Haemost* 74:294-301.
- Hajjar K, Jacovina A, Chacko J. 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269:21191-21197.
- Hajjar K, Krishnan S. 1999. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 9:128-138.
- Hall HG. 1978. Hardening of the sea urchin fertilization envelope by peroxidase-catalyzed phenolic coupling of tyrosines. *Cell* 15:343-355.
- Handrow R, First N, Parrish J. 1989. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* 252:174-182.
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq* 4:361-393.
- Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45:378-391.

- Harvey M, Leco K, Arcellana-Panlilio M, Zhang X, Edwards D, Schultz G. 1995. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development* 121:1005-1014.
- Hedrick JL, Wardrip NJ. 1986. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal Biochem* 157:63-70.
- Heeb M, España F, Geiger M, Collen D, Stump D, Griffin J. 1987. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 262:15813-15816.
- Heinecke JW, Shapiro BM. 1990. Superoxide peroxidase activity of ovoperoxidase, the cross-linking enzyme of fertilization. *J Biol Chem* 265:9241-9246.
- Henkin J, Marcotte P, Yang H. 1991. The plasminogen-plasmin system. *Prog Cardiovasc Dis* 34:135-164.
- Ho H, Suarez S. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122:519-526.
- Holt W, Fazeli A. 2010. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol Reprod Dev*. DOI 10.1002/mrd.21234.
- Holý L, Vanatka F, Lopatárová M. 1992. [Descent of ova and embryos in cows superovulated with serum gonadotropin]. *Vet Med (Praha)* 37:353-364.
- Hong C, Chiang B, Huang J, Wu P. 1985. Two plasminogen activators, streptokinase and urokinase, stimulate human sperm motility. *Andrologia* 17:317-320.
- Hoodbhoy T, Talbot P. 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 39:439-448.
- Hoodbhoy T, Talbot P. 2001. Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Mol Reprod Dev* 58:223-235.
- Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J. 2005. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem* 280:12721-12731.
- Horvath PM, Kellom T, Caulfield J, Boldt J. 1993. Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 34:65-72.
- Hosoe M, Shioya Y. 1997. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote* 5:371-376.
- Hsueh A, Liu Y, Cajander S, Peng X, Dahl K, Kristensen P, Ny T. 1988. Gonadotropin-releasing hormone induces ovulation in hypophysectomized rats: studies on ovarian tissue-type plasminogen activator activity, messenger ribonucleic acid content, and cellular localization. *Endocrinology* 122:1486-1495.
- Huarte J, Belin D, Bosco D, Sappino AP, Vassalli JD. 1987a. Plasminogen activator and mouse spermatozoa: urokinase synthesis in the male genital tract and binding of the enzyme to the sperm cell surface. *J Cell Biol* 104:1281-1289.

- Huarte J, Belin D, Vassalli A, Strickland S, Vassalli JD. 1987b. Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenylation of dormant tissue-type plasminogen activator mRNA. *Genes Dev* 1:1201-1211.
- Huarte J, Belin D, Vassalli JD. 1985. Plasminogen activator in mouse and rat oocytes: induction during meiotic maturation. *Cell* 43:551-558.
- Huarte J, Vassalli JD, Belin D, Sakkas D. 1993. Involvement of the plasminogen activator/plasmin proteolytic cascade in fertilization. *Dev Biol* 157:539-546.
- Hughes DC, Barratt CLR. 1999. Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim Biophys Acta* 1447:303-306.
- Huhtinen M, Koskinen E, Skidmore JA, Allen WR. 1996. Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. *Theriogenology* 45:719-726.
- Hunter RH. 1967. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotrophin. *Vet Rec* 81:21-23.
- Hunter RH. 1976. Sperm-egg interactions in the pig: monospermy, extensive polyspermy, and the formation of chromatin aggregates. *J Anat* 122:43-59.
- Hunter RH. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 63:109-117.
- Hunter RH. 1982. Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos. Zaragoza. Acribia, 362.
- Hunter RH. 1988. The Fallopian tubes: Their role in fertility and infertility. Springer-Verlag, Berlin 191.
- Hunter RH. 1989. Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zool J Linn Soc* 95:117-124.
- Hunter RH. 1990. Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 40:211-226.
- Hunter RH. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 29:385-391.
- Hunter RH. 1993. Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev* 35:324-327.
- Hunter RH. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 45:281-290.
- Hunter RH. 2008. Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by peri-ovulatory graafian follicles. *Mol Reprod Dev* 75:167-174.
- Hunter RH, Hall J. 1974. Capacitation of boar spermatozoa: synergism between uterine and tubal environments. *J Exp Zool* 188:203-213.
- Hunter RH, Nichol R, Crabtree SM. 1980. Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reprod Nutr Dev* 20:1869-1875.

- Hunter RH, Nichol R. 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* 228:121-128.
- Hunter RH, Wilmut I. 1984. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev* 24:597-608.
- Hunter RH, Vajta G, Hyttel P. 1998. Long-term stability of the bovine block to polyspermy. *J Exp Zool* 280:182-188.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. 1986. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fert* 78:615-625.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fert Suppl* 38:35-47.
- Ignotz G, Lo M, Perez C, Gwathmey T, Suarez S. 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 64:1806-1811.
- Igusa Y, Miyazaki S, Yamashita N. 1983. Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. *J Physiol* 340:633-647.
- Irigoyen J, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56:104-132.
- Iwasaki S, Nakahara T. 1990. Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro. *Theriogenology* 34:683-690.
- Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A, Nakahara T. 1989. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. *Gamete Res* 22:83-91.
- Jaffe L, Cross N. 1986. Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Annu Rev Physiol* 48:191-200.
- Jaffe L, Gould-Somero M, Holland L. 1982. Studies of the mechanism of the electrical polyspermy block using voltage clamp during cross-species fertilization. *J Cell Biol* 92:616-621.
- Jahn R, Grubmuller H. 2002. Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 14:488-495.
- Jimenez Diaz M, Giunta S, Valz-Gianinet J, Pereyra-Alfonso S, Flores V, Miceli D. 2000. Proteases with plasminogen activator activity in hamster oviduct. *Mol Reprod Dev* 55:47-54.
- Jimenez-Diaz M, Roldan M, Miceli DC. 2002. Localization of plasminogen in the extracellular matrix of hamster eggs: exogenous activation by streptokinase. *Mol Reprod Dev* 61:528-535.
- Jones K. 2005. Mammalian egg activation: from Ca<sup>2+</sup> spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 130:813-823.
- Jones P, Vernon M, Muse K, Curry TJ. 1989. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 68:1039-1045.

- Kaaekuahiwi M, Menino AJ. 1990. Relationship between plasminogen activator production and bovine embryo development in vitro. *J Anim Sci* 68:2009-2014.
- Kaji K, Kudo A. 2004. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127:423-429.
- Karakji E, Tsang B. 1995a. Follicular stage-dependent regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system by transforming growth factor-alpha in vitro. *Biol Reprod* 52:411-418.
- Karakji E, Tsang B. 1995b. Growth hormone releasing factor and vasoactive intestinal peptide stimulate rat granulosa cell plasminogen activator activity in vitro during follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 107:105-112.
- Karakji E, Tsang B. 1995c. Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. *Biol Reprod* 53:1302-1310.
- Kawarsky S, Basrur P, Stubbings R, Hansen P, King W. 1996. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biol Reprod* 54:53-59.
- Keski-Oja J, Vaheri A. 1982. The cellular target for the plasminogen activator, urokinase, in human fibroblasts - 66 000 dalton protein. *Biochim Biophys Acta* 720:141-146.
- Kim NH, Funahashi H, Abeydeera L, Moon S, Prather R, Day B. 1996. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 107:79-86.
- Kim NH, Menino AR, Jr. 1995. Effects of stimulators of protein kinases A and C and modulators of phosphorylation on plasminogen activator activity in porcine oocyte-cumulus cell complexes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 40:364-370.
- Kim TS, Sa SJ, Shin MY, Jang DM, Kwon SH, Kwon EH, Cho KH, Park CK, Lee DS. 2009. Stimulation of plasminogen activator activity by free radicals in boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 114:228-237.
- King G, Macpherson J. 1973. A comparison of two methods for boar semen collection. *J Anim Sci* 36:563-565.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ. 1994. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 15:468-478.
- Knudsen B, Silverstein R, Leung L, Harpel P, Nachman R. 1986. Binding of plasminogen to extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:10765-10771.
- Kolbe T, Holtz W. 2005. Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 63:1695-1705.
- Kölle S, Dubielzig S, Reese S, Wehrend A, König P, Kummer W. 2009. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod* 81:267-274.

- Kooistra T, Schrauwen Y, Arts J, Emeis J. 1994. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol* 59:233-255.
- Kouba AJ, Alvarez IM, Buhi WC. 2000a. Identification and localization of plasminogen activator inhibitor-1 within the porcine oviduct. *Biol Reprod* 62:501-510.
- Kouba AJ, Burkhardt BR, Alvarez IM, Goodenow MM, Buhi WC. 2000b. Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal regulation during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *Mol Reprod Dev* 56:378-386.
- Kruip TAM, Cran DG, van Beneden TH, Dieleman SJ. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Res* 8:29-47.
- Kruithof E. 1988. Plasminogen activator inhibitors. A review. *Enzyme* 40:113-121.
- Kruithof E, Baker M, Bunn C. 1995. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 86:4007-4024.
- Kruithof E, Vassalli J, Schleuning W, Mattaliano R, Bachmann F. 1986. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem* 261:11207-11213.
- Kubagawa H, Watts J, Corrigan C, Edmonds J, Sztul E, Browse J, Miller M. 2006. Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol* 8:1143-1148.
- Lacroix M, Parvinen M, Fritz IB. 1981. Localization of testicular plasminogen activator in discrete portions (stage VII and VIII) of the seminiferous tubule. *Biol Reprod* 25:143-146.
- Lacroix M, Smith F, Fritz IB. 1977. Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 9:227-236.
- Lafrance M, Croze F, Tsang B. 1993. Influence of growth factors on the plasminogen activator activity of avian granulosa cells from follicles at different maturational stages of preovulatory development. *J Mol Endocrinol* 11:291-304.
- Laiho M, Keski-Oja J. 1989. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res* 49:2533-2553.
- LaPolt P, Soto D, Su J, Campen C, Vaughan J, Vale W, Hsueh A. 1989. Activin stimulation of inhibin secretion and messenger RNA levels in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol* 3:1666-1673.
- Leese HJ. 1988. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 82:843-856.
- Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 19:1580-1586.
- Leipnitz G, Miyashita C, Heiden M, von Blohn G, Kohler M, Wenzel E. 1988. Reference values and variability of plasminogen in healthy blood donors and its relation to parameters of the fibrinolytic system. *Haemostasis* 18:61-68.



- Leyton L, Saling P. 1989. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57:1123-1130.
- Liedholm P, Astedt B. 1975. Fibrinolytic activity of the rat ovum, appearance during tubal passage and disappearance at implantation. *Int J Fertil* 20:24-26.
- Lijnen H, Collen D. 1982. Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin. *Semin Thromb Hemost* 8:2-10.
- Lijnen H, Van Hoef B, Collen D. 1986. Comparative kinetic analysis of the activation of human plasminogen by natural and recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* 884:402-408.
- Lison D, Tas S, Gennart J, Psalti I, De Cooman S, Lauwerys R. 1993. Plasminogen activator activity and fertilizing ability of human spermatozoa. *Int J Androl* 16:201-206.
- Liu K, Liu XY, Du Q, Zhou HM, Lin X, Hu ZY, Zhang GY, Zhang GH. 1996. Preliminary studies on the role of plasminogen activator in seminal plasma of human and rhesus monkey. *Mol Hum Reprod* 2:99-104.
- Liu YX. 1988. Interaction and regulation of plasminogen activators and their inhibitor in rat follicles during periovulatory periods. *Sci Sin B* 31:47-57.
- Liu YX. 2004. Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front Biosci* 9:3356-3373.
- Liu YX. 2007. Involvement of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization. *Semin Thromb Hemost* 33:29-40.
- Liu YX, Ny T, Sarkar D, Loskutoff D, Hsueh AJ. 1986. Identification and regulation of tissue plasminogen activator activity in rat cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology* 119:1578-1587.
- Liu YX, Hsueh AJ. 1987. Plasminogen activator activity in cumulus-oocyte complexes of gonadotropin-treated rats during the periovulatory period. *Biol Reprod* 36:1055-1062.
- Liu YX, Cajander S, Ny T, Kristensen P, Hsueh A. 1987. Gonadotropin regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in rat granulosa and theca-interstitial cells during the periovulatory period. *Mol Cell Endocrinol* 54:221-229.
- Liu YX, Peng XR, Ny T. 1991. Tissue-specific and time-coordinated hormone regulation of plasminogen-activator-inhibitor type I and tissue-type plasminogen activator in the rat ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Eur J Biochem* 195:549-555.
- Liu YX, Feng Q, Peng X, Tor N. 1994. Secretion of plasminogen activator inhibitor type 1 by cultured ovarian cells obtained from gonadotropin-treated immature rats. *Sci China B* 37:940-947.
- Liu YX, Chen Y, Shi F, Feng Q. 1995. Studies on the role of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type-1 in rat corpus luteum of pregnancy. *Biol Reprod* 53:1131-1138.

- Liu YX, Liu K, Feng Q, Hu ZY, Liu HZ, Fu GQ, Li YC, Zou RJ, Ny T. 2004. Tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 are coordinately expressed during ovulation in the rhesus monkey. *Endocrinology* 145:1767-1775.
- Llanos M, Lui C, Meizel S. 1982. Studies of phospholipase A2 related to the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 221:107-117.
- Lloyd R, Elliott R, Fazeli A, Watson P, Holt W. 2009. Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro. *Reprod Fertil Dev* 21:408-418.
- Loskutoff D, Linders M, Keijer J, Veerman H, van Heerikhuizen H, Pannekoek H. 1987. Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 26:3763-3768.
- Loskutoff D, Sawdey M, Mimuro J. 1989. Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 9:87-115.
- Loskutoff D, van Mourik J, Erickson L, Lawrence D. 1983. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2956-2960.
- Lund L, Georg B, Nielsen L, Mayer M, Danø K, Andreassen P. 1988. Plasminogen activator inhibitor type 1: cell-specific and differentiation-induced expression and regulation in human cell lines, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mol Cell Endocrinol* 60:43-53.
- Macchione E, Epifano O, Stefanini M, Belin D, Canipari R. 2000. Urokinase redistribution from the secreted to the cell-bound fraction in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Biol Reprod* 62:895-903.
- Malinowski D, Sadler J, Davie E. 1984. Characterization of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human and bovine plasminogen. *Biochemistry* 23:4243-4250.
- Maluchnik D, Borsuk E. 1994. Sperm entry into fertilised mouse eggs. *Zygote* 2:129-131.
- Manásková P, Peknicová J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *J Reprod Immunol* 74:103-113.
- Mann G, Robinson R, Hunter M. 2007. Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology* 67:1256-1261.
- Marotti K, Belin D, Strickland S. 1982. The production of distinct forms of plasminogen activator by mouse embryonic cells. *Dev Biol* 90:154-159.
- Mayer M. 1990. Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. *Clin Biochem* 23:197-211.
- McAvey B, Wortzman G, Williams C, Evans J. 2002. Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol Reprod* 67:1342-1352.

- McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, Day BN. 2003. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 69:828-834.
- McClellan D, Rowlands IW. 1942. Role of hyaluronidase in fertilization. *Nature* 150:627-628.
- McCulloh D, Rexroad CJ, Levitan H. 1983. Insemination of rabbit eggs is associated with slow depolarization and repetitive diphasic membrane potentials. *Dev Biol* 95:372-377.
- Meizel S. 1985. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 174:285-302.
- Menino AJ, Williams J. 1987. Activation of plasminogen by the early bovine embryo. *Biol Reprod* 36:1289-1295.
- Menino AR, Jr., Dyk AR, Gardiner CS, Grobner MA, Kaaekuahiwi MA, Williams JS. 1989. The effects of plasminogen on in vitro ovine embryo development. *Biol Reprod* 41:899-905.
- Mignatti P, Rifkin D. 1996. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 49:117-137.
- Miles L, Plow E. 1985. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J Biol Chem* 260:4303-4311.
- Miller DJ, Gong X, Decker G, Shur BD. 1993a. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cell Biol* 123:1431-1440.
- Miller DJ, Gong X, Shur BD. 1993b. Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118:1279-1289.
- Mimuro J, Schleef R, Loskutoff D. 1987. Extracellular matrix of cultured bovine aortic endothelial cells contains functionally active type 1 plasminogen activator inhibitor. *Blood* 70:721-728.
- Miyazaki S, Igusa Y. 1981. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature* 290:702-704.
- Mizukami I, Faulkner N, Gyetko M, Sitrin R, Todd Rr. 1995. Enzyme-linked immunoabsorbent assay detection of a soluble form of urokinase plasminogen activator receptor in vivo. *Blood* 86:203-211.
- Moller CC, Wassarman PM. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 132:103-112.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 40:197-210.
- Moser T, Enghild J, Pizzo S, Stack M. 1993. The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* 268:18917-18923.

- Mosher D. 1990. Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. *Clin Cardiol* 13:15-11.
- Motlik J, Fulka J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *J Expl Zool* 198:155-162.
- Mullins D, Bazer F, Roberts R. 1980. Secretion of a progesterone-induced inhibitor of plasminogen activator by the porcine uterus. *Cell* 20:865-872.
- Murray SC, Smith TT. 1997. Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril* 68:351-357.
- Muñoz-Gotera R, Hernández-González E, Mendoza-Hernández G, Contreras R, Mújica A. 2001. Exocytosis of a 60 kDa protein (calreticulin) from activated hamster oocytes. *Mol Reprod Dev* 60:405-413.
- Mwanza M, Razdan P, Hultén F, Einarsson S. 2002. Transport of fertilised and unfertilized ova in sows. *Anim Reprod Sci* 74:69-74.
- Myles DG, Primakoff P. 1997. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56:320-327.
- Nagyová E, Vanderhyden B, Procházka R. 2000. Secretion of paracrine factors enabling expansion of cumulus cells is developmentally regulated in pig oocytes. *Biol Reprod* 63:1149-1156.
- Nakano M, Yonezawa N. 2001. Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs* 168:65-75.
- Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N, Kuwabara Y, Miyazaki S. 1997. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol Hum Reprod* 3:1087-1093.
- Nielsen L, Andreasen P, Grøndahl-Hansen J, Skriver L, Danø K. 1986. Plasminogen activators catalyse conversion of inhibitor from fibrosarcoma cells to an inactive form with a lower apparent molecular mass. *FEBS Lett* 196:269-273.
- Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M. 1994. Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta* 1201:7-14.
- Norwood JT, Hein CE, Halbert SA, Anderson RG. 1978. Polycationic macromolecules inhibit cilia-mediated ovum transport in the rabbit oviduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4413-4416.
- Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, Dessy F. 1993. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. *Theriogenology* 39:811-821.
- Ny T, Bjersing L, Hsueh AJ, Loskutoff DJ. 1985. Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology* 116:1666-1668.
- Ny T, Liu YX, Ohlsson M, Jones PB, Hsueh AJ. 1987. Regulation of tissue-type plasminogen activator activity and messenger RNA levels by gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells and cumulus-oocyte complexes. *J Biol Chem* 262:11790-11793.

- O'Connell M, Canipari R, Strickland S. 1987. Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. *J Biol Chem* 262:2339-2344.
- O'Rand MG, Welch JE, Fisher SJ. 1986. Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. *Adv Exp Med Biol* 205:131-144.
- Odor D, Blandau R. 1949. The frequency of occurrence of supernumerary sperm in rat ova. *Anat Rec* 104:1-9.
- Ortiz M, Bedregal P, Carvajal M, Croxatto H. 1986. Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol Reprod* 34:777-781.
- Ossowski L. 1988. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol* 107:2437-2445.
- Ossowski L, Quigley J, Kellerman G, Reich E. 1973. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Requirement of plasminogen for correlated changes in cellular morphology, colony formation in agar, and cell migration. *J Exp Med* 138:1056-1064.
- Ossowski L, Russo-Payne H, Wilson E. 1991. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res* 51:274-281.
- Pacey A, Davies N, Warren M, Barratt C, Cooke I. 1995. Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod* 10:2603-2609.
- Padilla S, Galle P, Ellegood J, Mahesh V, McDonough P. 1986. Plasminogen in peritoneal fluid: a possible nonsteroidal indicator of ovulation. *Fertil Steril* 46:1071-1076.
- Papanikolaou T, Amiridis G, Dimitriadis I, Vainas E, Rekkas C. 2008. Effect of plasmin, plasminogen activators and a plasmin inhibitor on bovine in vitro embryo production. *Reprod Fertil Dev* 20:320-327.
- Park KW, Choi SH, Song XX, Funahashi H, Niwa K. 1999. Production of plasminogen activators (PAs) in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro: effects of epidermal growth factor on production of PAs in oocytes and cumulus cells. *Biol Reprod* 61:298-304.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40:1020-1025.
- Peng X, Hsueh A, Ny T. 1993. Transient and cell-specific expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 results in controlled and directed proteolysis during gonadotropin-induced ovulation. *Eur J Biochem* 214:147-156.
- Petters RM, Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48:61-73.
- Pincus G. 1936. *The eggs of mammals*. New York. The Macmillan Company 160.
- Piquette G, Crabtree M, el-Danasouri I, Milki A, Polan M. 1993. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human cumulus and granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 76:518-523.

- Plesner T, Behrendt N, Ploug M. 1997. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells* 15:398-408.
- Ploug M, Rønne Berendt N, Jensen A, Blasi F, Dannø K. 1991. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 266:1926-1933.
- Plow E, Felez J, Miles L. 1991. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 66:32-36.
- Politis I, Srikandakumar A, Turner J, Tsang B, Ainsworth L, Downey B. 1990a. Changes in and partial identification of the plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor systems during ovarian follicular maturation in the pig. *Biol Reprod* 43:636-642.
- Politis I, Wang L, Turner J, Tsang B. 1990b. Changes in tissue-type plasminogen activator-like and plasminogen activator inhibitor activities in granulosa and theca layers during ovarian follicle development in the domestic hen. *Biol Reprod* 42:747-754.
- Pursel VG, Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40:99-102.
- Pyke C, Eriksen J, Solberg H, Nielsen B, Kristensen P, Lund L, Danø K. 1993. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett* 326:69-74.
- Queenan JJ, Kao L, Arboleda C, Ulloa-Aguirre A, Golos T, Cines D, Strauss Jr. 1987. Regulation of urokinase-type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. *J Biol Chem* 262:10903-10906.
- Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J. 1998. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125:2415-2424.
- Rankin TL, Talbot P, Lee E, Dean J. 1999. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126:3847-3855.
- Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. 2003. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 5:33-43.
- Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77:3346-3352.
- Raum D, Marcus D, Alper C, Levey R, Taylor P, Starzl T. 1980. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208:1036-1037.
- Reddy K, Markus G. 1972. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. *J Biol Chem* 247:1683-1691.
- Redlitz A, Plow E. 1995. Receptors for plasminogen and t-PA: an update. *Baillieres Clin Haematol* 8:313-327.

- Reich R, Miskin R, Tsafiriri A. 1985. Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. *Endocrinology* 116:516-521.
- Reich R, Miskin R, Tsafiriri A. 1986. Intrafollicular distribution of plasminogen activators and their hormonal regulation in vitro. *Endocrinology* 119:1588-1593.
- Reinthaller A, Kirchheimer J, Deutinger J, Bieglmayer C, Christ G, Binder B. 1990. Plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor, and fibronectin in human granulosa cells and follicular fluid related to oocyte maturation and intrafollicular gonadotropin levels. *Fertil Steril* 54:1045-1051.
- Rekkas CA, Belibasaki S, Taitzoglou I, Kokolis N, Smokovitis A. 1991. Increased plasminogen activator activity and plasminogen activator inhibition in spermatozoa and seminal plasma of the ram after serum gonadotrophin (PMSG) administration. Correlation with the increased level of testosterone in the blood. *Andrologia* 23:273-278.
- Rekkas CA, Kokolis N, Belibasaki S, Tsantarliotou M, Smokovitis A. 2000. Effect of alpha-tocopherol on plasma testosterone and plasminogen activator activity or inhibition in ram spermatozoa. *Theriogenology* 53:751-760.
- Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V, Vainas E, Brem G. 2002. Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 57:1897-1905.
- Relucenti M, Heyn R, Correr S, Familiari G. 2005. Cumulus oophorus extracellular matrix in the human oocyte: a role for adhesive proteins. *Ital J Anat Embryol* 110:219-224.
- Rickles R, Darrow A, Strickland S. 1988. Molecular cloning of complementary DNA to mouse tissue plasminogen activator mRNA and its expression during F9 teratocarcinoma cell differentiation. *J Biol Chem* 263:1563-1569.
- Rifkin D, Moscatelli D, Gross J, Jaffe E. 1983. Proteases, angiogenesis, and invasion. *Symp Fundam Cancer Res* 36:187-200.
- Rijken D, Juhan-Vague I, Collen D. 1983. Complexes between tissue-type plasminogen activator and proteinase inhibitors in human plasma, identified with an immunoradiometric assay. *J Lab Clin Med* 101:285-294.
- Robitaille G, St-Jacques S, Potier M, Bleau G. 1988. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod* 38:687-694.
- Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Einarsson S. 1990a. Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 13:238-243.
- Rodriguez-Martinez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S, Larsson K. 1990b. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Hist Embryol* 19:16-36.
- Roldan A, Cubellis M, Masucci M, Behrendt N, Lund L, Danø K, Appella E, Blasi F. 1990. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J* 9:467-474.
- Roldan-Olarte M, Jimenez-Diaz M, Miceli DC. 2005. Plasminogen detection in oocytes and plasminogen activator activities in the porcine oviduct during the estrous cycle. *Zygote* 13:115-123.

- Romar R, Coy P, Gadea J, Rath D. 2005. Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 85:287-300.
- Sa S, Rhee H, Cheong H, Yang B, Park C. 2006. Effects of plasmin on sperm-oocyte interactions during in vitro fertilization in the pig. *Anim Reprod Sci* 95:273-282.
- Sabapathy K, Pepper M, Kiefer F, Möhle-Steinlein U, Tacchini-Cottier F, Fetka I, Breier G, Risau W, Carmeliet P, Montesano R, Wagner E. 1997. Polyoma middle T-induced vascular tumor formation: the role of the plasminogen activator/plasmin system. *J Cell Biol* 137:953-963.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG. 1986. Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP3 macromolecule (Mr 55 000) of the pig zona pellucida. *J Reprod Fertil* 76:575-585.
- Sakai M, Watanuki M, Matsuo O. 1989. Mechanism of fibrin-specific fibrinolysis by staphylokinase: participation of alpha 2-plasmin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 162:830-837.
- Saksela O. 1985. Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta* 823:35-65.
- Saksela O, Vihko K. 1986. Local synthesis of plasminogen by the seminiferous tubules of the testis. *FEBS Lett* 204:193-197.
- Saksela O, Rifkin D. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 4:93-126.
- Saling P. 1981. Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zonae pellucidae. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6231-6235.
- Salonen E, Saksela O, Vartio T, Vaheri A, Nielsen L, Zeuthen J. 1985. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem* 260:12302-12307.
- Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. 1992. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 151:541-551.
- Sappino A, Huarte J, Belin D, Vassalli J. 1989. Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J Cell Biol* 109:2471-2479.
- Sasaki T, Morita T, Iwanaga S. 1986. Identification of the plasminogen-binding site of human alpha 2-plasmin inhibitor. *J Biochem* 99:1699-1705.
- Schatten H. 2008. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem Cell Biol* 129:667-686.
- Schatz F, Lockwood C. 1993. Progesterin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 77:621-625.



- Schneiderman J, Adar R, Savion N. 1991. Changes in plasmatic tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activity during acute arterial occlusion associated with severe ischemia. *Thromb Res* 62:401-408.
- Seiffert D, Keeton M, Eguchi Y, Sawdey M, Loskutoff D. 1991. Detection of vitronectin mRNA in tissues and cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9402-9406.
- Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Takaoka Y, Ishikawa M, Dukelow W. 1995. Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 105(1):85-90.
- Shapiro R, Duquette J, Roses D, Nunes I, Harris M, Kamino H, Wilson E, Rifkin D. 1996. Induction of primary cutaneous melanocytic neoplasms in urokinase-type plasminogen activator (uPA)-deficient and wild-type mice: cellular blue nevi invade but do not progress to malignant melanoma in uPA-deficient animals. *Cancer Res* 56:3597-3604.
- Sherman M, Strickland S, Reich E. 1976. Differentiation of early mouse embryonic and teratocarcinoma cells in vitro: plasminogen activator production. *Cancer Res* 36:4208-4216.
- Shetty J, Wolkowicz MJ, Digilio LC, Klotz KL, Jayes FL, Diekman AB, Westbrook VA, Farris EM, Hao Z, Coonrod SA, Flickinger CJ, Herr JC. 2003. SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction. *J Biol Chem* 278:30506-30515.
- Sidhu K, Guraya S. 1989. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol* 118:231-280.
- Sirard MA. 1989. Practical aspects of in-vitro fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 38:127-134.
- Smith TT. 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol Reprod* 58:1102-1104.
- Smith TT, Yanagimachi R. 1991. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 91:567-573.
- Smokovitis A, Kokolis N, Alexopoulos C, Alexaki E, Eleftheriou E. 1987. Plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition in spermatozoa and seminal plasma of man and various animal species-Effect of plasmin on sperm motility. *Fibrinolysis* 1:253-257.
- Smokovitis A, Kokolis N, Alexaki-Tzivanidou A. 1988. The plasminogen activator activity is markedly increased mainly at the area of the rupture of the follicular wall at the time of ovulation. *Anim Reprod Sci* 16:285-294.
- Smokovitis A, Kokolis N, Taitzoglou I, Rekkas C. 1992. Plasminogen activator: the identification of an additional proteinase at the outer acrosomal membrane of human and boar spermatozoa. *Int J Fertil* 37:308-314.
- Smokovitis A, Kouimtzis S, Koutsouris C, Kokolis N, Kouskoura T. 1989. The effects of intrafollicular injection of plasmin and  $\epsilon$ -aminocaproic acid on the ovulation in the ewe. *Fibrinolysis* 3:227-230

- Stack M, Pizzo S. 1993. Modulation of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by synthetic peptides derived from the amino-terminal heparin binding domain of fibronectin. *J Biol Chem* 268:18924-18928.
- Stephens R, Pöllänen J, Tapiovaara H, Leung K, Sim P, Salonen E, Rønne E, Behrendt N, Danø K, Vaheiri A. 1989. Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biol* 108:1987-1995.
- Stewart-Savage J, Bavister B. 1991. Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. *Mol Reprod Dev* 30:390-395.
- Strickland S, Beers WH. 1976. Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J Biol Chem* 251:5694-5702.
- Strickland S, Reich E, Sherman M. 1976. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* 9:231-240.
- Strickland S, Huarte J, Belin D, Vassalli A, Rickles R, Vassalli J. 1988. Antisense RNA directed against the 3' noncoding region prevents dormant mRNA activation in mouse oocytes. *Science* 241:680-684.
- Stump D, Thienpont M, Collen D. 1986. Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from human urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma. *J Biol Chem* 261:12759-12766.
- Suarez SS. 1987. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 36:203-210.
- Suarez SS. 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* 58:1105-1107.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 37:140-143.
- Suarez SS. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev* 19:103-110.
- Suarez SS. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 52:455-462.
- Suarez SS, Revah I, Lo M, Kollé S. 1998. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol Reprod* 59:39-44.
- Sun Q, Lai L, Bonk A, Prather R, Schatten H. 2001. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Mol Reprod Dev* 59:192-198.
- Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S, Kamiya T, Saito H. 1983. Normal titer of functional and immunoreactive protein-C inhibitor in plasma of patients with congenital combined deficiency of factor V and factor VIII. *Blood* 62:1266-1270.

- Tabibzadeh S. 1996. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 2:77-92.
- Tahara M, Tasaka K, Masumoto N, Mammoto A, Ikebuchi Y, Miyake A. 1996. Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization in living mouse eggs. *Am J Physiol* 270:1354-1361.
- Taipale J, Koli K, Keski-Oja J. 1992. Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J Biol Chem* 267:25378-25384.
- Taitzoglou IA, Kokolis N, Smokovitis A. 1996. Release of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor from spermatozoa of man, bull, ram and boar during acrosome reaction. *Mol Androl* 8:187-197.
- Taitzoglou IA, Chapman DA, Killian GJ. 2003. Induction of the acrosome reaction in bull spermatozoa with plasmin. *Andrologia* 35:112-116.
- Taitzoglou IA, Chapman DA, Zervos IA, Killian GJ. 2004. Effect of plasmin on movement characteristics of ejaculated bull spermatozoa. *Theriogenology* 62:553-561.
- Takada A, Sugawara Y, Takada Y. 1989. Enhancement of the activation of Glu-plasminogen by urokinase in the simultaneous presence of tranexamic acid or fibrin. *Haemostasis* 19:26-31.
- Talbot P, Franklin L. 1978. Trypsinization increases lectin-induced agglutinability of uncapacitated guinea pig sperm. *J Exp Zool* 204:291-297.
- Talbot P, Chacon R. 1981. Detection of modifications in the tail of capacitated guinea pig sperm using lectins. *J Exp Zool* 216:435-444.
- Talbot P, Dicarlantonio G. 1983. The oocyte-cumulus complex: Ultrastructure of the extracellular components in hamsters and mice. *Gamete Res* 10:127-143.
- Talbot P, Geiske C, Knoll M. 1999. Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 10:5-8.
- Talevi R, Gualtieri R. 2001. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biol Reprod* 64:491-498.
- Talevi R, Zagami M, Castaldo M, Gualtieri R. 2007. Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the fallopian tube epithelium. *Biol Reprod* 76:728-735.
- Tardif S, Dubé C, Bailey J. 2003. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68:207-213.
- Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. 2000. Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Hum Reprod Update* 6:532-549.
- Tatone C, Van Eekelen C, Colonna R. 1994. Plasma membrane block to sperm entry occurs in mouse eggs upon parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 38:200-208.

- Tawia S, Lopata A. 1992. The fertilization and development of mouse oocytes following cortical granule discharge in the presence of a protease inhibitor. *Hum Reprod* 7:1004-1009.
- Thibault C, Gerard M, Menezo Y. 1975. Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 45:605-610.
- Thibault C, Levasseur M. 1988. Ovulation. *Hum Reprod* 3:513-523.
- Thibault C, Szollosi D, Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 27:865-896.
- Tordai H, Bányai L, Patthy L. 1999. The PAN module: the N-terminal domains of plasminogen and hepatocyte growth factor are homologous with the apple domains of the prekallikrein family and with a novel domain found in numerous nematode proteins. *FEBS Lett* 461:63-67.
- Töpfer-Petersen E, Petrounkina AM, Ekhlesi-Hundrieser M. 2000. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* 60-61:653-662.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela P, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostàlovà Z, Sanz L, Calvete J. 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30:217-224.
- Töpfer EK, Killian GJ, Way A, Engel B, Woelders H. 1999. Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 115:175-183.
- Tsafriiri A, Reich R. 1999. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:1-11.
- Tsantarliotou M, Zervos I, Vatzias G, Billinis C, Taitzoglou I, Kokolis N. 2005. Plasminogen activator activity in the porcine oviduct during the oestrous cycle. *Theriogenology* 64:1007-1015.
- Tucker H, Mottonen J, Goldsmith E, Gerard R. 1995. Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nat Struct Biol* 2:442-445.
- Tutuncu L, Stein P, Ord TS, Jorgez CJ, Williams CJ. Calreticulin on the mouse egg surface mediates transmembrane signaling linked to cell cycle resumption. *Dev Biol* 270:246-260.
- Uhrin P, Dewerchin M, Hilpert M, Chrenek P, Schöfer C, Zechmeister-Machhart M, Krönke G, Vales A, Carmeliet P, Binder B, Geiger M. 2000. Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J Clin Invest* 106:1531-1539.
- Vadnais M, Galantino-Homer H, Althouse G. 2007. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl* 53:109-123.
- Valinsky J, Reich E, Le Douarin N. 1981. Plasminogen activator in the bursa of Fabricius: correlations with morphogenetic remodeling and cell migrations. *Cell* 25:471-476.
- Van Leuven F, Cassiman J, Van den Berghe H. 1978. Uptake and degradation of alpha2-macroglobulin-protease complexes in human cells in culture. *Exp Cell Res* 117:273-282.

- Van Meijer M, Pannekoek H. 1995. Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 9:263-276.
- Vassalli J, Sappino A, Belin D. 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88:1067-1072.
- Velasquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jimenez-Movilla M, Gallego RG, Ballesta J, Aviles M, Coy P. 2007. Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev* 74:617-628.
- Verstraete M, Collen D. 1986. Thrombolytic therapy in the eighties. *Blood* 67:1529-1541.
- Vihko KK, Suominen JJ, Parvinen M. 1984. Cellular regulation of plasminogen activator secretion during spermatogenesis. *Biol Reprod* 31:383-389.
- Villalón M, Ortiz M, Aguayo C, Muñoz J, Croxatto H. 1982. Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. *Biol Reprod* 26:337-341.
- Visconti P, Bailey J, Moore G, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf G. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129-1137.
- Visconti P, Moore G, Bailey J, Leclerc P, Connors S, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf G. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121:1139-1150.
- Vishwakarma p. 1962. The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertil Steril* 13:481-485.
- Wallén P, Wiman B. 1972. Characterization of human plasminogen. II. Separation and partial characterization of different molecular forms of human plasminogen. *Biochim Biophys Acta* 257:122-134.
- Wang C, Leung A. 1983. Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 112:1201-1207.
- Wang L, Croze F, Morley P, Tsang B. 1993. Granulosa-thecal cell interactions in the regulation of plasminogen activator activity during ovarian follicular development in the hen. *Biol Reprod* 49(5):924-932.
- Wang W, Hosoe M, Li R, Shioya Y. 1997a. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Dev Growth Differ* 39:607-615.
- Wang WH, Sun QY, Hosoe M, Shioya Y, Day BN. 1997b. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol Reprod* 56:1376-1382.
- Wang WH, Macháty Z, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. 1998. Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biol Reprod* 58:1357-1366.
- Wang WH, Day B, Wu G. 2003. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc Res Tech* 61:335-341.

- Wang WH, Sun QY. 2006. Meiotic spindle, spindle checkpoint and embryonic aneuploidy. *Front Biosci* 11:620-636.
- Wassarman PM. 2009. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *Bioessays* 31:153-158.
- Werb Z, Mainardi C, Vater C, Harris EJ. 1977. Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N Engl J Med* 296:1017-1023.
- Wessel G, Brooks J, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S. 2001. The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol* 209:117-206.
- White K, Pate B, Sessions B. 2010. Oolemma Receptors and Oocyte Activation. *Syst Biol Reprod Med* 56:365-375.
- Whiteside E, Kan M, Jackson M, Thompson J, McNaughton C, Herington A, Harvey M. 2001. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and activity during early embryo development in the cow. *Anat Embryol* 204:477-483.
- Wiman B, Collen D. 1978. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* 272:549-550.
- Witte T, Schäfer-Somi S. 2007. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 102:181-193.
- Wohl RC, Sinio L, Robbins KC. 1982. Methods for studying fibrinolytic pathway components in human plasma. *Thromb Res* 27:523-535.
- Wohlwend A, Belin D, Vassalli J. 1987. Plasminogen activator-specific inhibitors produced by human monocytes/macrophages. *J Exp Med* 165:320-339.
- Wolf DP. 1978. The block to sperm penetration in zonal-free mouse eggs. *Dev Biol* 64:1-10.
- Wolf DP, Hamada M. 1977. Induction of zonal and egg plasma membrane blocks to sperm penetration in mouse eggs with cortical granule exudate. *Biol Reprod* 17(3):350-354.
- Wolf DP, Hamada M. 1979. Sperm binding to the mouse egg plasmalemma. *Biol Reprod* 21:205-211.
- Wolf DP, Edidin M, Handyside AH. 1981. Changes in the organization of the mouse egg plasma membrane upon fertilization and first cleavage: indications from the lateral diffusion rates of fluorescent lipid analogs. *Dev Biol* 85:195-198.
- Wu H, Chang B, Wu D, Chang L, Gong C, Lou K, Shi G. 1990. Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *J Biol Chem* 265:19658-19664.
- Xu KP, Greve T, Smith S, Hyttel P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet Scand* 27:505-519.
- Yamada M, Gentry P. 1995. The hemostatic profile of equine ovarian follicular fluid. *Thromb Res* 77:45-54.

- Yamada M, Horiuchi T, Oribe T, Yamamoto S, Matsushita H, Gentry P. 1996. Plasminogen activator activity in the bovine oocyte-cumulus complex and early embryo. *J Vet Med Sci* 58:317-322.
- Yan J, Feng Q, Liu H, Fu G, Liu Y. 1999. Expression of tPA, LH receptor and inhibin alpha, beta(A) subunits during follicular atresia in rats. *Sci China C Life Sci* 42:583-590.
- Yanagimachi R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2:371-372.
- Yanagimachi R, Suzuki F. 1985. A further study of lysolecithin-mediated acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res* 11:29-40.
- Yang CH, Yanagimachi R. 1989. Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster. *Human Reprod* 4:63-71.
- Yeung W, Lee K, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M, Chiu P. 2009. Effects of glycodepins on functional competence of spermatozoa. *J Reprod Immunol* 83:26-30.
- Yoshida M, Cran D, Pursel V. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 36:462-468.
- Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M. 2001. Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem* 268:3587-3594.
- Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. 1998. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 273:7488-7494.
- Zanetti S, Monclus M, Rensetti D, Fornés M, Aveldaño M. 2010. Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie* doi:10.1016/j.biochi.20.10.08.015.
- Zaneveld L, Polakoski K, Williams W. 1973. A proteinase and proteinase inhibitor of mammalian sperm acrosomes. *Biol Reprod* 9:219-225.
- Zeng Y, Clark E, Florman H. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171:554-563.
- Zhang X, Kidder G, Zhang C, Khamsi F, Armstrong D. 1994. Expression of plasminogen activator genes and enzymatic activities in rat preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 101:235-240.
- Zhang X, Pang Z, Chen S, Xing F. 2002. Effect of conditioned media from decidual cell culture on the expression of genes regulating the invasion of trophoblastic cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22:588-591.
- Zhang X, Rutledge J, Armstrong D. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev* 28:292-296.

- Zhang X, Rutledge J, Khamsi F, Armstrong D. 1992. Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Mol Reprod Dev* 32:28-32.
- Zuccotti M, Yanagimachi R, Yanagimachi H. 1991. The ability of hamster oolemma to fuse with spermatozoa: its acquisition during oogenesis and loss after fertilization. *Development* 112:143-152.