

Falla de Fertilización en Reproducción Asistida: Causas oocitarias y espermáticas a través del estudio celular

Dra. Vanesa Rawe

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR)

Laboratorio de Biología, Investigación y Estudios Especiales (LABINEE)

Prof. Dr. Aníbal Acosta

El presente trabajo es parte de la tesis doctoral presentada en la Universidad de Buenos Aires y realizada en CEGyR por la Dra. Rawe. vrawe@cegyr.com / vanerawe@hotmail.com

Eventos involucrados durante la fertilización normal

Se puede afirmar que tanto el espermatozoide como el oocito están equipados con un grupo haploide de cromosomas cada uno y un arsenal de organelas complementarias y moléculas necesarias para asegurar una apropiada fertilización. En esta revisión focalizaré mi atención a los eventos celulares normales y anormales luego que el espermatozoide penetra al oocito. Pondré especial énfasis en los distintos ejemplos de falla de fertilización en las que incluiré incidencias y posibles causas de cada uno. La interacción entre los espermatozoides con las células del cúmulus y la zona pelúcida, así como también, la fusión de membranas de ambas gametas no serán discutidas en este artículo.

Activación de oocitaria

La mayoría de los oocitos de mamíferos están detenidos en metafase de la segunda división meiótica antes de ser fertilizados. La activación de un oocito quiescente por parte de un espermatozoide, resulta en la culminación de la segunda meiosis y la expulsión de las cromátides hermanas de cada uno de los cromosomas maternos en forma de segundo cuerpo polar (Schultz y Kopf, 1995), evento que se acompaña por un bloqueo de la poliespermia por exocitosis de los gránulos corticales.

Al contrario de lo que ocurre en peces, equinodermos y ranas, en los cuales el espermatozoide induce un único incremento monotónico en la concentración de Ca^{2+} intracitoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), la señal de activación en mamíferos consiste en una serie de picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ conocido como **oscilaciones**. En oocitos humanos el espermatozoide induce oscilaciones que pueden durar de 5-6 hs (Sousa, 1996), la frecuencia de aparición varía entre 2- 35 minutos, hecho que es altamente variable de oocito en oocito, pero relativamente estable dentro de un mismo oocito (Sousa, 1996). Existe una reacción temprana de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que en el oocito humano se caracteriza por un grupo inicial de 3-6 picos rápidos, que son después seguidos por picos de menor frecuencia para el resto del período de oscilaciones. Se cree que las oscilaciones de Ca^{2+} en oocitos de mamíferos comparten un código de frecuencias que debe completarse para una correcta activación (Miyazaki y col., 1993).

En vista de la larga duración de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por el espermatozoide en los oocitos humanos, está claro que la gameta masculina no sólo debe poseer la **llave** para iniciar las oscilaciones (ser el gatillador), sino también el mensaje necesario para modificar las propiedades de uno o varios elementos involucrados en la regulación de la homeostasis del $[\text{Ca}^{2+}]_i$

(canales y reservorios de Ca^{2+} intracelulares), propiedad por la que se denomina **oscilador** (Swann y col., 1990).

Se han formulado tres hipótesis para explicar el papel del espermatozoide durante la activación oocitaria. La teoría original fue formulada por Jaffe (1980), y considera que el espermatozoide *per se* es una fuente de Ca^{2+} para inducir activación. La segunda sugiere que la interacción ligando/receptor, a nivel de la membrana plasmática del oocito, gatilla una cascada de señalización que culmina con la activación del oocito (Jones y Whittingham, 1996). La tercera y más reciente hipótesis (Jones y col. 1998), sugiere que el espermatozoide capaz de fertilizar, introduce un factor soluble directamente dentro del citoplasma del oocito. De una manera u otra, está generalmente aceptado que la señal para la activación oocitaria es aportada por el espermatozoide (Swann, 1996).

Algunos estudios sugieren que uno o más de esos factores estarían asociados a la teca perinuclear (TP) del espermatozoide (Kimura y col., 1998), estructura que se forma durante la espermatogénesis entre el acrosoma (post acrosomal) y la envoltura nuclear, y serían transmitidos al citoplasma del oocito durante su disolución en el proceso de fertilización.

Formación del centrosoma del cigoto

El objetivo mayor del proceso de fertilización, es decir, la unión de los cromosomas paternos y maternos que darán lugar al genoma embrionario, se logra con la unión de los pronúcleos. Este proceso es dirigido por microtúbulos del oocito y depende de la capacidad del cigoto de reconstruir el centrosoma (Schatten, 1994). Con algunas pocas excepciones, la movilidad citoplásmica de los microtúbulos de células en interfase, incluyendo células somáticas, oocitos y células espermáticas, es gobernada por un centrosoma activo compuesto por dos centriolos en forma de cilindros rodeados por un halo denso de material pericentriolar en los cuales reside la capacidad de reclutar microtúbulos. Estas estructuras denominadas centrosomas, se duplican durante la mitosis y la meiosis para dar lugar a los dos polos del huso

meiótico o mitótico (Gould y Borisy, 1977; Kalnins y Rogers, 1992; Schatten, 1994). El centrosoma de las células de la espermatogénesis está inicialmente involucrado en la generación del axonema del espermatozoide y es reducido más tarde a un único centriolo inactivo, o desmantelado en roedores (Woolley y Fawcett, 1973; Manandhar y col., 1998; Sutovsky y col., 1999). De manera contraria a la retención de un centriolo del espermatozoide que retiene su capacidad de duplicarse, los oocitos animales pierden ambos centriolos durante la ovogénesis, pero acumulan un excesivo conjunto de material pericentriolar y proteínas del centrosoma (Szollosi y col., 1972; Palazzo y col., 1992). Durante la fertilización, el centriolo con el que contribuye el espermatozoide utiliza el conjunto de proteínas de material pericentriolar para su duplicación y conversión en el centrosoma del cigoto que será capaz de dirigir el desarrollo pronuclear y la formación del primer huso mitótico (Navara y col., 1994; Sutovsky y col., 1996a). **Por lo tanto, el desarrollo embrionario normal depende del aporte del centriolo espermático para la organización de un centrosoma y aparato mitótico activo.**

Formación de los pronúcleos paterno y materno

Además de los datos sobre la necesidad de una correcta biogénesis de la TP para una normal espermatogénesis, la TP compacta y anormal sería una barrera para una normal fertilización, evitando el remodelado del núcleo espermático para pasar a ser pronúcleo masculino. El núcleo del espermatozoide se transforma en pronúcleo masculino con la liberación de las protaminas espermáticas seguido de una captación de histonas y otras moléculas del citoplasma oocitario (Ecklund y Levine, 1975; Kopecny y Pavlok, 1975; Perrault y col., 1984). Este evento sería imposible sin la eliminación de la TP del espermatozoide (Sutovsky y col., 1997a), y sin la formación de novo de la envoltura nuclear (EN) **con complejos de poros nucleares funcionales** (Sutovsky y col., 1998 b). Algunos datos en ratón (Usui, 1996) y bovinos (Sutovsky y col., 1997a) sugieren que la TP es removida de la superficie del núcleo espermático en

un estadio inicial de incorporación y que la cromatina espermática entra al oocito completamente “desnuda” de toda sus membranas, incluyendo su envoltura nuclear intrínseca (Usui y Yanagimachi, 1976; Usui y col., 1997).

La persistencia de la TP sobre la superficie de espermatozoide de toros intactos inyectados dentro del citoplasma de oocitos bovinos maduros, causa la falla de desarrollo pronuclear (Sutovsky y col., 1997). De manera similar, algunos estudios reportaron en humanos (Bourgain y col., 1998) y en monos (Hewitson y col., 1996), la presencia de un desarrollo pronuclear aberrante asociado con la persistencia de acrosoma y/o TP subacrosomal. **Con esto se sugiere que la remoción de la TP del espermatozoide es un prerrequisito para el desarrollo pronuclear normal en mamíferos.**

A continuación o quizá concomitante con la remoción de la membrana plasmática y la teca perinuclear del espermatozoide, el núcleo masculino es privado de su cubierta nuclear en el momento de entrar en contacto con el citoplasma del oocito (Usui, 1966; Usui y Yanagimachi, 1976; Usui y col., 1997). La nueva envoltura nuclear es reconstituida alrededor del núcleo espermático en descondensación a partir de membranas de vesículas oocitarias (Sutovsky y Schatten, 1998). De la misma manera, el material nuclear femenino (ahora haploide) se rodeará de la envoltura nuclear a partir de estas vesículas oocitarias. Ese paso universal en la fertilización marca la formación de compartimentos nucleares y citoplásmicos en el oocito fecundado y conlleva la necesidad de establecer una comunicación bidireccional y un intercambio de moléculas necesarias para el desarrollo pronuclear y embrionario normal. El canal principal para el transporte nucleoplásmico en células animales es el **complejo de poros nucleares (CPN)** y proteínas O-glicosiladas de la familia de las nucleoporinas (Pante y Aebi, 1996).

Estudio celular de las fallas de fertilización

Durante años, el laboratorio de investigación básica del CEGyR (LABINEE) ha estudiado los diferentes motivos de falla de fertilización luego de FIV e ICSI. El objetivo

principal fue analizar los eventos celulares involucrados en la aparición de los fenómenos frecuentes de falla de fertilización que caracterizan la detención precoz del desarrollo embrionario en humanos. Bajo esta denominación se contempla a toda desorganización espacio-temporal de la dinámica del desarrollo del primer ciclo celular del cigoto, manifestada como la falta de formación de los pronúcleos materno y/o paterno a las 16-18hs post FIV o ICSI.

Tradicionalmente la falla de fertilización ha sido explicada por el desbalance cromosómico de la gametas masculinas y/o femenina al momento de la fertilización. Alternativamente, la detención precoz del desarrollo en embriones humanos puede tener su origen en alteraciones de la dinámica de reorganización citoesqueletaria del oocito, producto de desarreglos en los ritmos de oscilación de las concentraciones de Ca²⁺ intracitoplásmica y de otras anomalías oocitarias y espermáticas no evidentes a través del estudio por microscopía convencional.

Materiales y Métodos

Los siguientes son datos de más de 1500 oocitos humanos que fallaron en la fertilización luego de FIV e ICSI estudiados por inmunofluorescencia **a través del análisis del citoesqueleto (tubulinas), organización del ADN de los pronúcleos materno y paterno, organización del aster espermático, y otras estructuras celulares importantes (como por ejemplo el complejo de poros nucleares y teca perinuclear) según el caso en cuestión.**

Previo al procesamiento de inmunofluorescencia, se estudiaron los oocitos que no mostraron pronúcleos por microscopía de contraste de fase de modo de obtener información acerca del estado del citoplasma (homogeneidad, granulosidad, tamaño de espacio perivitelino y color), número de cuerpos polares y presencia de fragmentos. Se consideró oocito no fecundado a aquel en el que no se visualiza la aparición de pronúcleos bajo microscopio de luz transmitida (1000x) y a aquellos en los que ocurrió el desarrollo de pronúcleos pero no culminaron con el proceso de fertilización luego de FIV o ICSI (detenidos).

Luego de la remoción de la zona pelúcida con ácido tyrodes, se fijó al material de estudio con 2% de formaldehído en buffer pipes. La permeabilización se logró con 0,1% de tritón X-100 y se bloqueó el material con PBS+ albúmina bovina previo a la incubación con los anticuerpos de interés. El ADN se visualizó luego de la incubación con Hoescht. El estudio se realizó por microscopía de epifluorescencia con los filtros adecuados para la visualización de los distintos fluorocromos.

Resultados y discusión

A partir de los resultados obtenidos, se pudo establecer la existencia de distintos niveles de detención del desarrollo en las fases iniciales del proceso de fertilización.

A continuación se describen los distintos estadios hallados luego de cada técnica de Reproducción Asistida (RA). Las categorías descritas se hallaron tanto en oocitos sometidos a FIV como ICSI, aunque las frecuencias de cada categoría variaron según la técnica de RA utilizada.

Descripción cualitativa de las categorías halladas

a) Ausencia de penetración del espermatozoide (FIV) o expulsión del espermatozoide (ICSI)

Este estadio se evidenció por la *ausencia* de material genético paterno y de flagelo espermático dentro del citoplasma del oocito. En estos casos sólo se pudo observar la presencia de la placa metafásica del oocito sin rastros de espermatozoide en el citoplasma oocitario. El citoplasma del oocito se visualiza normalmente homogéneo con respecto a la distribución de b tubulinas (uniformes, sin polimerización de microtúbulos). Ver figura A y B.

FIV: La principal causa de falla de fertilización luego de FIV fue la ausencia de penetración espermática (59,2% de los oocitos estudiados). La causa de este tipo de fallas se podría relacionar con alguna falla durante los primeros eventos de interacción entre gametas. Recientemente, Liu y Baker (2000) reportaron que el 70% de los pacientes con falla total de fertilización luego de FIV tenían defectos de interacción

espermatozoide-oocito a nivel de la zona pelúcida. No se pueden descartar en esta categoría los defectos de movilidad espermática, capacitación, reacción acrosómica o capacidad de unión a la zona pelúcida.

ICSI: En el 12,1% de los oocitos estudiados no se observó la presencia del espermatozoide dentro del citoplasma. Este evento puede deberse a la salida del espermatozoide a través del surco de inyección.

b) Fallas total de activación del oocito, con condensación prematura de cromosomas o acompañado de falla de descondensación del material nuclear paterno

La presencia de **falla total de activación** oocitaria se caracterizó por la ausencia de expulsión del segundo cuerpo polar y la presencia intacta de la placa metafásica de la segunda meiosis del oocito. Conjuntamente con esta situación, se observan dos situaciones de condensación de la cromatina del espermatozoide: (i) presencia de cromosomas paternos rodeados por microtúbulos, situación que se denomina **condensación prematura de cromosomas** (PCC), (ii) presencia de un **espermatozoide con distintos grados de descondensación del material nuclear** (falla de descondensación del material nuclear paterno) desde “intacto” (mayor grado de condensación de la cromatina del espermatozoide, consecuencia de una falla de activación espermática) a descondensado en distintos grados.

La evidencia de este tipo de falla de fertilización se representa en las figuras C y D.

FIV: Un 10,5% de los oocitos estudiados fallaron en la activación oocitaria y mostraron en su interior un espermatozoide con alguna de las situaciones antes descritas (PCC o Falla de descondensación del material nuclear paterno en distintos grados).

ICSI: La principal causa de falla de fertilización luego de ICSI resultó ser la falla de activación oocitaria con distintos grados de descondensación del material nuclear paterno (36,5% de los oocitos estudiados).

La **condensación prematura de cromosomas paternos** (PCC) fue descrita por Schmiady y col. (1986), quienes observa-

ron una frecuencia del 14% en oocitos no fecundados luego de FIV y está caracterizada por la presencia de cromosomas del espermatozoide en oocitos maduros inseminados que no muestran pronúcleos. El mecanismo de PCC es poco claro. Una posible explicación fue dada por Schmiady y col. (1986), en la que tratan de explicar las causas como dependientes de la detención permanente de los oocitos en MII, generando una falla de activación. La situación resulta de la continua presencia de factores citoplásmicos oocitarios que provocan una condensación prematura de cromosomas. Los altos niveles del MPF serían los responsables de la denominada 'inmadurez citoplásmica oocitaria' observada concomitantemente con PCC.

Una de las anomalías reportadas luego de ICSI, es el retraso en la activación oocitaria. Como consecuencia, el núcleo masculino puede estar expuesto por algún tiempo al MPF no inactivado. Se sabe que un corto tiempo inicial de exposición al MPF es necesario para la ruptura de la membrana nuclear del espermatozoide, pero que el desarrollo subsiguiente del pronúcleo es un evento MPF independiente. Esta observación pone de manifiesto la importancia de una fina coordinación entre la exposición del núcleo masculino a factores citosólicos y la progresión de la activación oocitaria.

Swann y col. (1990) y Dozortzev y col. (1995) demostraron que los espermatozoides contienen un factor citosólico termo-sensible denominado oscilina, que cuando es inyectado en el oocito es capaz de provocar activación, incluso en ausencia de ADN paterno. La ausencia de este factor o quizá la ineficiente actividad del mismo en espermatozoides 'de mala calidad', como los utilizados en ICSI, explicaría al menos en parte, la falla de activación oocitaria observada. En casos de factor masculino severo se ha descrito una mayor tasa de fragmentación del ADN del espermatozoide y una tasa significativamente mayor de fragmentación en espermatozoides que fallaron en su descondensación, que aquellos que no lo hicieron (Lopes y col., 1998). Los autores proponen una asociación entre

tasa de fragmentación y pérdida de actividad de la mencionada oscilina que explicaría la falta de activación pos ICSI.

Además de la inexistencia de interacción entre superficies y la disfunción en la primera señal de liberación de Ca^{2+} que ocurre con ICSI, existen dos tipos de anomalías más severas: un inusual retraso en el comienzo de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por el espermatozoide y una sustitución de las oscilaciones de Ca^{2+} con un largo incremento de la concentración de Ca^{2+} interno no oscilatorio (Tesarik y Testart, 1994).

Cabe agregar que la mayoría de los casos de falla de activación oocitaria acompañadas de falla de descondensación del material nuclear masculino se dan cuando se utilizan espermatozoides de biopsias testiculares en ICSI, evento que sugiere que la utilización de espermatozoides que no han completado la maduración en el tracto genital masculino poseerían una incompleta o anormal contenido de los factores de activación oocitarios necesarios durante la fertilización.

c) Defectos en la formación/ aposición de pronúcleos

Especial énfasis se le dio a la incompleta formación del áster espermático o falta total del mismo como causa de la anormal formación/ aposición de pronúcleos. El estadio de *pronúcleos* no formados (o incompletamente formados) se caracteriza por el desarrollo de material nuclear disperso en el citoplasma del oocito en dos grupos bien definidos (interfase, ver panel central). En esta categoría la disposición de los microtúbulos fue homogénea y en estado polimerizado (señal de que el oocito había sido activado) en todo el citoplasma del oocito y alrededor del material nuclear en cuestión.

La evidencia de este tipo de falla de fertilización se representa en las figuras E y F.

FIV: Incidencia: **15,2%** de los oocitos estudiados.

ICSI: Incidencia: **21,5%** de los oocitos estudiados.

Un caso peculiar de arresto en la formación de pronúcleos (2PN detenidos, Figura F) se da cuando la distribución de los complejos de poros nucleares no es adecuada. Como consecuencia de este evento, se hipotetiza que 'el diálogo entre el citoplasma y los pronúcleos no es el normal' y como consecuencia el desarrollo no prosigue de manera adecuada.

d) **Detención en metafase de la primera división mitótica del cigoto**

La **detención en metafase** de la primera mitosis del embrión se caracterizó por la presencia de material nuclear condensado (cromosomas) en forma de placa metafásica. La distribución de b tubulinas fue acorde con la característica disposición de un huso mitótico con microtúbulos en forma de áster bipolar.

FIV: Incidencia: **3,8%** de los oocitos estudiados.

ICSI: Incidencia: **18,5%** de los oocitos estudiados.

Este evento podría ser reflejo de un mayor nivel de 'desarreglo' de la activación oocitaria, proceso en el cual están implicadas las oscilaciones de Ca^{2+} intracitoplásmicos, como ya ha sido discutido anteriormente.

Ello conduce a una gama más amplia de alteraciones del primer ciclo celular si se compara con FIV en donde se observó una incidencia del 3,8% en el grupo estudiado ya que la mayor causa de falla de fertilización en FIV está supeditada al reconocimiento primario de gametas.

La evidencia de este tipo de falla de fertilización se representa en las figura G.

Otros

En baja proporción se detectaron eventos no directamente relacionados a la dinámica de reorganización del citoesqueleto. Uno de estos ejemplos es la penetración de dos espermatozoides (*dispermia*), situación en la que se visualizan dos grupos de ADN espermático y la presencia de dos flagelos.

Una situación muy peculiar es el *despegado de cola del espermatozoide*. Esta situación trae como consecuencia la falla en la fertilización ya que no se reclutan los microtúbulos a partir del centro organizador de microtúbulos situado en la base de la cabeza del espermatozoide. En esta causa de falla de fertilización se puede evidenciar la presencia de material genético paterno separado del flagelo espermático (ver Figura H).

Otra situación dentro de esta categoría es la alteración de la placa metafásica del oocito debida a una interferencia por parte del espermatozoide. En esta causa de falla de fertilización se puede observar la presencia de material genético paterno y el flagelo espermático sobre la Metafase II del oocito.

FIV: un **10,5%** de los oocitos estudiados presentan situaciones en esta categoría.

ICSI: un **10,7%** de los oocitos estudiados presentan situaciones en esta categoría

Un breve resumen de las diferentes causas de falla de fertilización y las posibles explicaciones de las mismas se visualiza en la siguiente tabla: (ver página siguiente)

En resumen, existen diferentes causas por las cuales la fertilización puede fallar luego de FIV e ICSI. Tanto la gameta masculina como la femenina contribuyen con diferentes organelas al momento de la fertilización. Una anormal distribución o alguna falla funcional de alguna de ellas pueden generar la detención precoz del desarrollo en embriones humanos. La alteraciones puede tener su origen en la dinámica de reorganización del citoesqueleto del oocito, desarreglos en los ritmos de oscilación de las concentraciones de Ca^{2+} intracitoplásmicas, anomalías estructurales espermáticas, etc. como ha sido explicado en el presente artículo.

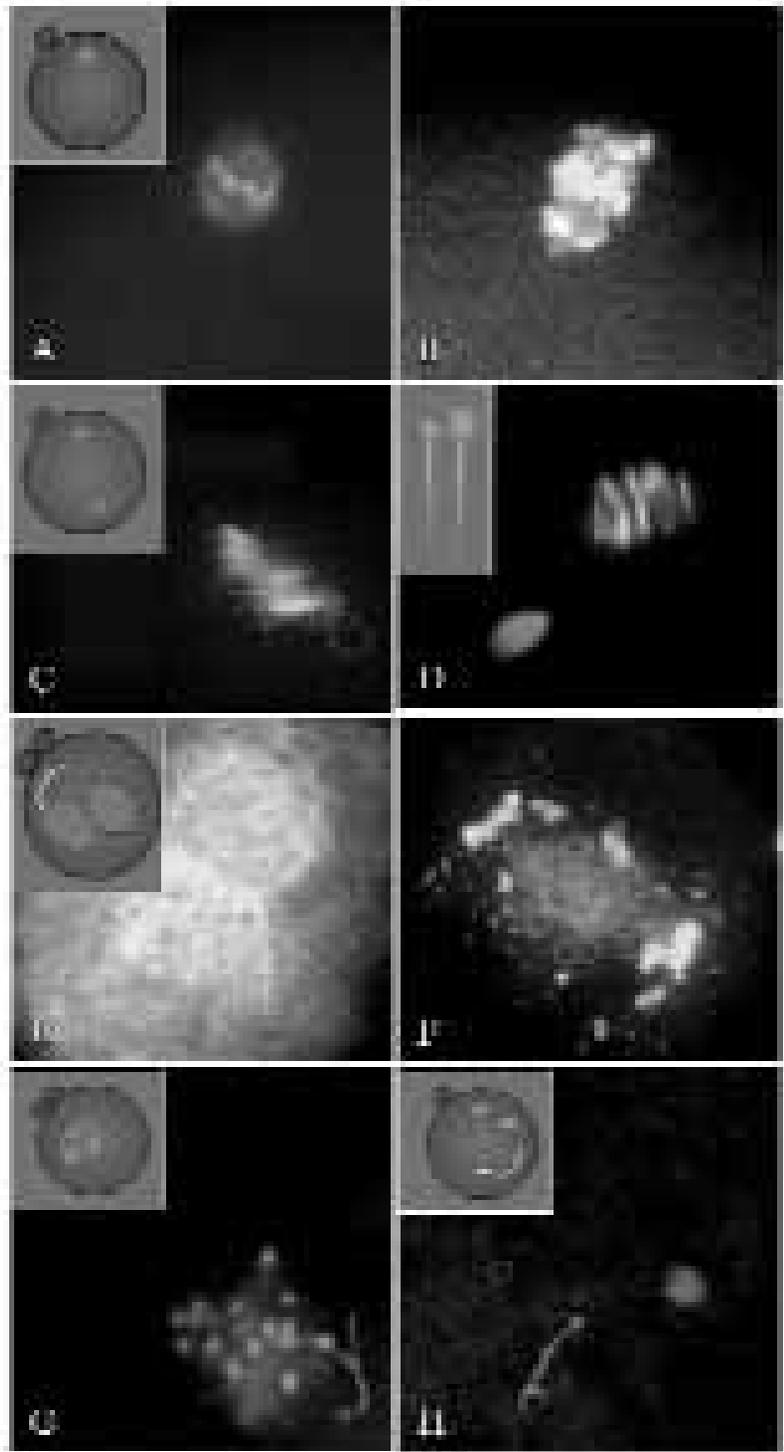
La inmunofluorescencia es una técnica excelente para el estudio de organelas específicas durante la fertilización normal y anormal. Con esta metodología podemos obtener una aproximación a los eventos intracelulares para un mejor entendimiento

	FIV	ICSI
Ausencia de spz. (espermatozoide)	59,2%	12,1%
POSIBLES CAUSAS	defectuoso pegado a ZP, Falla reacción acrosómica, etc.	liberación por surco inyección
Fallas activación oocito	10,5%	36,5%
POSIBLES CAUSAS Idem FIV e ICSI	+PCC: – c/spz. normal: oocito c/cit. inmaduro (alto MPF) – c/spz. anormal: oocito c/cit. inmaduro (alto MPF) y/o spz. c/ factor activación anormal	+ falla descondensación spz. – c/spz. normal; oocito incapáz de remodelar ADN spz. – c/spz. anormal: spz. c/ factor activación anormal
Defectos Pronúcleos	15,2%	21,5%
POSIBLES CAUSAS Idem FIV e ICSI	– falla formación aster espermático: anormal centríolo proximal o material pericentriolar (falta reclutamiento tubulinas) – 2pn detenidos: anormal diálogo citoplasma–pronúcleos (anormal CPN, ver texto)	
Detención 1ra metafase	3,8%	18,5%
POSIBLES CAUSAS Idem FIV e ICSI	– Anormal homeostasis de calcio oocitario (más afectado durante ICSI con spz. anormal por irregularidades en las oscilaciones de Ca ²⁺) – Proteínas 'check points' detectan irregularidades en ciclo celular	
Otros	10,5%	10,7%
POSIBLES CAUSAS	Variadas según el caso (ver texto)	Variadas según el caso (ver texto)

durante los problemas de falla de fertilización. Es importante mencionar aquí que todos los recientes desarrollos en reproducción asistida, ampliamente usados hoy en el mundo, son el resultado de investigaciones básicas en modelos animales llevadas a cabo en laboratorios de investigación de instituciones académicas.

Las investigaciones presentadas en este trabajo tienen un impacto directo en la

práctica médico-asistencial en nuestro Centro y son ofrecidas como parte de nuestro programa de reproducción asistida. La generación de conocimientos en áreas de la reproducción normal y patológica tiene una aplicación considerable si tenemos en cuenta que las conclusiones derivadas de estos estudios se pueden volcar de manera directa a las conductas a tomar en ciclos subsecuentes para los mismos pacientes.



PANELES (página anterior)

Los paneles A y B representan a la categoría Ausencia de penetración del espermatozoide (FIV) o expulsión del espermatozoide (ICSI).

En (A) se observa la falta de penetración del oocito por parte del espermatozoide. Se visualiza el material genético (cromosomas del oocito) y los microtúbulos del huso meiótico sin señal de activación oocitaria. Arriba a la izquierda se visualiza la representación esquemática de esta categoría. (B) En algunos casos se pueden observar anomalías en la segregación de los cromosomas maternos (en especial en oocitos de pacientes añosas). En esos casos los cromosomas no se encuentran alineados en la placa metafásica de manera normal.

Los paneles C y D representan a la categoría Fallas total de activación del oocito, con condensación prematura de cromosomas o acompañado de falla de descondensación del material nuclear paterno.

En (C) la imagen representa la penetración del espermatozoide con posterior condensación prematura de los cromosomas paternos (PCC). Se visualiza el material genético (cromosomas del oocito y espermatozoide) rodeados en ambos casos por microtúbulos. Nótese también el flagelo del espermatozoide asociado a los cromosomas paternos. Arriba a la izquierda se visualiza la representación esquemática de esta categoría. (D) La imagen representa la penetración del espermatozoide con posterior falla de descondensación del ADN. Se visualiza también el material genético materno (cromosomas del oocito rodeados por los

microtúbulos del huso meiótico). Arriba a la izquierda se visualiza la representación esquemática de esta categoría.

Los paneles E y F representan a la categoría Defectos en la formación/ aposición de pronúcleos.

En (E) se observa material nuclear propio de los pronúcleos en interfase. En este caso los microtúbulos del citoplasma oocitario se encuentran polimerizados. Arriba a la izquierda se visualiza la representación esquemática de esta categoría. (F) En el panel se visualizan 2pn detenidos con una agrupación de proteínas del complejo de poros nucleares, posible causa de la detención en este estadio (ver texto).

El panel G representa a la categoría Detención en metafase de la primera división mitótica del cigoto.

En (G) se observan los cromosomas paterno y materno en asociación con los microtúbulos del huso mitótico y el flagelo del espermatozoide. Arriba a la izquierda se observa la representación esquemática de esta categoría en la cual se evidencia la placa metafásica de la primera mitosis del embrión luego de la singamia.

El panel H representa a la categoría Otros.

En (H) se observa el material nuclear paterno no descondensado (cabeza del espermatozoide y el flagelo separado dentro del citoplasma oocitario). Arriba a la izquierda se observa un ejemplo de esta categoría (desprendimiento del flagelo del espermatozoide).

Agradecimientos

Especial agradecimiento al laboratorio de Embriología del CEGyR y a los médicos del Staff que con su constante curiosidad y vocación derivaron el estudio del material no fertilizado. El material presentado fue en parte procesado por el Dr. Alejandro Español.

El presente artículo contiene información publicada por nuestro grupo en los siguientes trabajos científicos:

- Failed fertilization after IVF and ICSI. *Alpha*, 5, 1999.
- Cytoskeletal organisation defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 510-516, 2000.
- Cellular events during fertilization failure in humans. *Fertil. Steril.*, 8: 375-376, 2001.
- Role of sperm function and sperm test. In: *Assisted Reproduction*, Indira Hinduja Eds., Oxford University Press, 2002.
- A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum. Reprod.*, 17, 2344-2349, 2002.
- Microtubules and parental genome organisation during abnormal fertilisation in humans. *Zygote*, 3, 223-228, 2002.
- Abnormal assembly of annulate lamellae: a possible explanation of fertilisation arrest at two pronuclei stage. *Hum. Reprod.* (trabajo de tapa), 3, 576-582, 2003.
- Should abnormal spermatozoa be used in assisted reproduction? Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. (Review). *Hum. Reprod. Update.* (trabajo de tapa), Volume 9, Issue 5, September, 405-428, 2003.
- A trial to restore defective human sperm centrosomal function. *Hum Reprod.* Jul; 20(7):1933-7, 2005.

Referencias

1. Bourgain, C., Nagy, Z. P., De Zutter, H., Van Ranst, H., Noguiera, D., y Van Steirteghem, A. C. (1998) Ultrastructure of gametes after intracytoplasmic sperm injection. In "Current Theory and Practice of ICSI." (P. Devroey, B. C. Tarlatzis, y A. Van Steirteghem, Eds.), *Hum. Reprod.* 13, Suppl. 1, 107-115.
2. Dozortsev, D., Rybouchkin, A. y DeSutter, P. (1995) Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection; the role of the sperm cell. *Hum. Reprod.*, 9, 2139-2144.
3. Ecklund, P. S., y Levine, L. (1975) Mouse sperm basic nuclear protein: electrophoretic characterization and fate after fertilization. *J. Cell Biol.* 66, 251-262.
4. Gould, R. R., y Borisy, G. G. (1977) The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biol.* 73, 601-615.
5. Hewitson, L.C., Simerly, C. R., Tengowski, M. W., Sutovsky, P., Navara, C. S., Haavisto, A. J., y Schatten, G. (1996) Microtubule and DNA configurations during Rhesus intracytoplasmic sperm injection: successes and failures. *Biol. Reprod.* 55, 271-280.
6. Jaffe, L. F. (1980) Calcium explosions as triggers of development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 339, 86-101.
7. Jones, K. T., Soeller, C. y Cannell, M. B. (1998) The passage of Ca²⁺ and fluorescent markers between the sperm and egg after fusion in the mouse. *Development* 125, 4627-4635.
8. Jones, K. T., y Whittingham, D. G. (1996) A comparison of sperm and IP3-induced Ca²⁺ release in activated and aging mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 178, 229-237.
9. Kalnins, V. I., y Rogers, K. A. (1992) The centrosome in stationary and migrating endothelial cells. In "The Centrosome" (Kalnins, V. I., Ed.), pp. 287-312. Academic Press. Inc., New York.
10. Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Perry, A. C. F., y Yanagimachi, H. (1998) Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.* 58, 1407-1415.

11. Kopecny, V., y Pavlok, A. (1975) Incorporation of Arginine³H into chromatin of mouse eggs shortly after sperm penetration. *Histochemistry* 45, 341-345.
12. Liu, D.Y., Baker, H.W. (2000) Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 3, 702-708.
13. Lopes, S., Juriscova, A., Casper R. y col. (1998) Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13, 703-708.
14. Manandhar, G., Sutovsky, P., Joshi, H. C., Stearns, T., y Schatten, G. (1998) Centrosome reduction during mouse spermiogenesis. *Dev. Biol.* 203, 424-434.
15. Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. y Honda, H. (1993) Essential role of the inositol 1,4,5- trisphosphate receptor/ Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammalian eggs. *Dev. Biol.*, 158: 62-78.
16. Navara, C. S., First, N. L., y Schatten, G. (1994) Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: The role of the sperm aster. *Dev. Biol.* 162: 29-40.
17. Palazzo, R. E., Vaisberg, E., Cole, R. W., y Rieder, C. L. (1992) Centriole duplication in lysates of *Spisula solodissima* oocytes. *Science* 256, 219-221.
18. Panté, N., y Aebi, U. (1996) Sequential binding of import ligands to distinct nuclear pore regions during their nuclear import. *Science* 273, 1729-1732.
19. Perreault, S. D., Wolf, R. A., y Zirkin, B. R. (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev. Biol.* 101, 160-167.
20. Schatten, G. (1994) The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev. Biol.*, 165, 299-335.
21. Schmiady, H., Sperling, K., Kentenich, H., y col. (1986) Prematurely condensed human sperm chromosomes after in vitro fertilization (IVF). *Hum. Genet.*, 74, 441-443.
22. Schultz, R. M., y Kopf, G. S. (1995) Molecular basis of mammalian egg activation. In "Current Topics in Developmental Biology." (R.A. Pedersen, y G. P. Schatten, Eds), Vol. 30, pp. 2162. Academic Press Inc., San Diego.
23. Sousa M., Barros A. y Tesarik J. (1996) The role of rianodine- sensitive Ca²⁺ stores in the Ca²⁺ oscillation machine of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 2: 265-272.
24. Sutovsky, P., Hewitson, L., Simerly, C. R., Tengowski, M. W., Navara, C. S., Haavisto, A., y Schatten, G. (1996) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for Rhesus monkey fertilization results in unusual chromatin, cytoskeletal, and membrane events, but eventually leads to pronuclear development and sperm aster assembly. *Hum. Reprod.* 11, 1703-1712.
25. Sutovsky, P., y Schatten, G. (1997) Depletion of glutathione during oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol. Reprod.* 56, 1503-1512.
26. Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., y Schatten, G. (1997) The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev. Biol.* 188, 75-84.
27. Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L. C., Tengowski, M. W., y Schatten, G. (1997b) Involvement of oocyte microvilli and microfilaments in the removal of the sperm's perinuclear theca: A prerequisite for the success of mammalian fertilization. *Mol. Biol. Cell* 8/Suppl: 106a.
28. Sutovsky, P., Tengowski, M.W., Navara, C.S., Zoran, S.S., y Schatten G. (1997) Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not non-mammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Mol. Reprod. Dev.* 47, 79-86.
29. Sutovsky, P., y Schatten, G. (1998) Structural aspects of mammalian fertilization: New discoveries and inspirations from the work of Daniel Szöllösi. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 629-641.
30. Sutovsky, P., Moreno, R., y Schatten, G. (1998a) Sperm mitochondrial ubiquitination and a model explaining the strictly maternal mtDNA inheritance in mammals. *Mol. Biol. Cell* 9/Suppl., 309a.

31. Sutovsky, P., Simerly, C, Hewitson, L., y Schatten, G. (1998b) Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes. *J. Cell Sci.* 111, 2841-2854.
32. Sutovsky, P., Manandhar, G., y Schatten, G. (1999) Biogenesis of the centrosome during mammalian gametogenesis and fertilization. *Protoplasma.*
33. Swann K. (1990). A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 110: 1295-1302.
34. Swann, K. (1996) Soluble sperm factors and Ca^{2+} release in eggs at fertilization. *Rev. Reprod.* 1, 33-39.
35. Szöllösi, D., Calarco, P., y Donahue, R. P. (1972) Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J. Cell Sci.* 11, 521-541.
36. Tesarik, J. y Testart, J. (1994). Treatment of sperm injected human oocytes with Ca^{2+} ionophore supports the development of Ca^{2+} oscillations. *Biol. Reprod.*, 51,385-391.
37. Usui, N. (1996) Morphological differences in nuclear materials released from hamster sperm heads at an early stage of incorporation into immature oocytes, mature oocytes, or fertilized eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 44:132-140.
38. Usui, N., A. Ogura, Y. Kimura, y Yanagimachi, R. (1997) Sperm nuclear envelope: breakdown of intrinsic envelope and de novo formation in hamster oocytes or eggs. *Zygote* 5, 35-46.
39. Usui, N., y Yanagimachi, R. (1976) Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization y early development. *J. Ultrastruct. Res.* 57: 276-288.
40. Woolley, D. M., y Fawcett, D. W. (1973) The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anat. Rec.* 177, 289-301.