

La humanidad in vitro

Jesús Ballesteros (Coord.)

A. Aparisi Miralles • V. Bellver

A. Calvo Meijide • E. Fernández Ruiz-Gálvez

U. Ferrer • J. López Guzmán

N. López Moratalla • C. Martínez Priego

J. A. Mínguez • J. Pérez Adán

E. Ruiz Abellán • J. Vidal Martínez

Biblioteca de derecho y ciencias de la vida

 EC
EDITORIAL
COMARES

JESÚS BALLESTEROS (coord.)

A. APARISI MIRALLES • V. BELLVER • A. CALVO MEIJIDE
E. FERNÁNDEZ RUIZ-GÁLVEZ • U. FERRER • J. LÓPEZ GUZMÁN
N. LÓPEZ MORATALLA • C. MARTÍNEZ PRIEGO • J. A. MÍNGUEZ
J. PÉREZ ADÁN • E. RUIZ ABELLÁN • J. VIDAL MARTÍNEZ

15

LA HUMANIDAD IN VITRO

GRANADA, 2002

BIBLIOTECA COMARES DE DERECHO Y CIENCIAS DE LA VIDA

Director:

CARLOS MARÍA ROMEO CASABONA

© LOS AUTORES

Editorial COMARES

Polígono Juncaril, parcela 208
Tlf. 958 46 53 82 • Fax 958 46 53 83
18220 Albolote (GRANADA)

E-mail: comares@comares.com
<http://www.comares.com>

ISBN: 84-8444-580-1 • Depósito legal: 1.333-2002

Fotocomposición, impresión y encuadernación: EDITORIAL COMARES, S.L.

SUMARIO

PRESENTACIÓN	IX
--------------------	----

PRIMERA PARTE

Sociología y economía del diseño de vidas

Cap. 1.º VIDA IN VITRO Y OPINIÓN PÚBLICA <i>Eduardo Ruiz Abellán</i>	3
Cap. 2.º SOCIOECONOMÍA Y REPROGENÉTICA: LA FIV COMO MANIFESTACIÓN DE LA PRIMACÍA DE LA DEMANDA SOLVENTE. <i>José Pérez Adán</i>	21

SEGUNDA PARTE

Enfoques culturales y perspectivas de campos en la fecundación in vitro

Cap. 3.º EL PERMISIVISMO ANTE LA FIV: A) LA VISIÓN ANGLONORTE-AMERICANA <i>Ángela Aparisi Miralles</i>	39
Cap. 4.º EL PERMISIVISMO ANTE LA FIV: B) EL INFORME PALACIOS, FUNDAMENTO DE LA LEGISLACIÓN ESPAÑOLA. <i>Alberto Calvo Meijide</i>	63

Cap. 5.º BASES ÉTICO-ANTROPOLÓGICAS DE LA LEGISLACIÓN ALEMANA SOBRE EL EMBRIÓN. <i>Urbano Ferrer</i>	87
Cap. 6.º ASPECTOS MÉDICOS DE LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA: AVANCES Y RIESGOS. <i>José Ángel Mínguez</i>	109
Cap. 7.º FIV Y DEFICIENCIAS EN LA RELACIÓN INTERGAMETOS Y EN LA RELACIÓN INICIAL MADRE-HIJO. <i>Natalia López Moratalla</i>	129
TERCERA PARTE	
La FIV: una cuestión de derechos	
Cap. 8.º MUJERES Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL. ¿AUTONOMÍA O SUJECCIÓN? <i>Encarnación Fernández Ruiz-Gálvez</i>	159
Cap. 9.º EL ESTATUTO BIOLÓGICO DEL EMBRIÓN. <i>José López Guzmán</i>	175
Cap. 10. EL EMBRIÓN HUMANO COMO INDIVIDUO: UNA VISIÓN EPIGENÉTICA. <i>Natalia López Moratalla y Consuelo Martínez-Priego</i>	193
Cap. 11. EL ESTATUTO ONTOLÓGICO DEL EMBRIÓN. <i>Jesús Ballesteros</i>	225
Cap. 12. EL ESTATUTO JURÍDICO DEL EMBRIÓN. <i>Vicente Bellver</i>	243
Cap. 13. DERECHOS INHERENTES EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA. <i>Jaime Vidal Martínez</i>	267
LOS AUTORES DE LA OBRA	299

CAPÍTULO SÉPTIMO

**FIV Y DEFICIENCIAS EN LA RELACIÓN INTERGAMETOS
Y EN LA RELACIÓN INICIAL MADRE-HIJO**

por

NATALIA LÓPEZ MORATALLA

La situación biológica primordial del ser humano engendrado y del producido

«El hombre resulta, como todo ser biológico, de la puesta en marcha de un proceso que llamamos «información genética» o herencia. Esta ofrece, como peculiaridad, la de preparar al ser vivo para un «último terminado («urdimbre») que al permitirle asimilar, incorporar, unas estructuras formales del ambiente a las estructuras organizadas por la herencia, le dotan de una máxima capacidad de adaptación dentro de su mundo peculiar. La llamada «necesidad de objeto» deriva pues, en el fondo, de un proceso genético, se confunde en cierto modo con la «herencia socio-genética» y es, por decirlo así, su manifestación visible en el mundo de la observación accesible al psicólogo y al psicoterapeuta. Pero tiene otras maneras de manifestarse, por ejemplo, en el «encuentro con el lenguaje» o con las «categorías lógico-matemáticas» en el «proceso de aprendizaje» (Piaget) o en el encuentro con los ritmos biológicos. Y en un plano más biológico aún, en el establecimiento de la autoinmunidad y de los enzimas adaptativos. Todos ellos fenómenos profundamente correlacionados y que nacen de una misma situación biológica primordial»¹. De acuerdo con Rof Carballo, lo originario es lo biológico que predispone para la primera interrelación o encuentro, que es afectivo, en concreto materno-filial, o tutorial en su defecto. Estos son los elementos fundantes de todo desarrollo humano: un esquema as-

¹ Rof Carballo J *El hombre como encuentro*. Alfaguara. Madrid, 1973 pág. 35.

cedente desde la información genética que permite dar cuenta de lo específico de la vida del ser humano.

El proceso que constituye un nuevo ser humano es la fecundación. Con él se prepara la materia recibida de los progenitores para dar una unidad celular con las características propias (el fenotipo) de inicio o arranque de un programa de vida individual; esto es, con capacidad de comenzar a emitir o expresar el mensaje genético del nuevo individuo. El engendrar de los padres, la fecundación natural, acaba tras un delicado proceso, en la formación de una célula con un fenotipo característico, el cigoto, que inicia su ciclo vital. Tras completar el programa de desarrollo embrionario, el nuevo ser humano se convierte en individuo adulto, que, una vez alcanzada la madurez sexual, producirá gametos que le permitan participar en la transmisión de la vida. En casos de infertilidad, cuando por algún motivo no se produce la fecundación en forma natural, la tecnología ha hecho posible recurrir a una variedad de técnicas de reproducción asistida que permiten la procreación sin curar la esterilidad.

Intentemos mostrar las diferencias de la «situación biológica primordial» de hijo generado «técnicamente» respecto del hijo engendrado «normalmente». O dicho con otras palabras, qué relaciones moleculares se pierden o debilitan cuando se recurre a la fecundación artificial. Consideraremos las relaciones moleculares e intercelulares en lo que se refiere:

- a) al «diálogo molecular» de los gametos paterno y materno,
- b) al «diálogo molecular» entre madre e hijo al paso de éste por las trompas en su camino al útero y, por último
- c) al establecimiento de una vida en común, una auténtica simbiosis, al anidar en el seno materno.

Comenzaremos por señalar las técnicas empleadas para conseguir el inicio de una nueva vida.

Técnicas de fecundación asistida

Entre las técnicas de reproducción asistida cabe mencionar la inseminación artificial, la transferencia de gametos al oviducto, y una variedad de procedimientos *in vitro* que conducen a la unión del óvulo con el espermatozoide, o con células indiferenciadas de la línea germinal masculina. Entre estas últimas se cuentan la fecundación *in vitro*, la inyección

intracitoplásmica de espermatozoides, o de progenitores de ellos. Aunque todas las mencionadas sean técnicas de concepción *in vitro*, sólo la «fecundación *in vitro*» (FIV) ha retenido este término y en cambio se utilizan términos diferentes para las otras técnicas.

La inseminación artificial consiste en el depósito de los espermatozoides en la cavidad uterina o en el cérvix uterino, sin o con tratamiento hormonal de la mujer para incrementar la producción de óvulos². La transferencia de gametos al oviducto (GIFT) se basa en la colocación simultánea de óvulos y espermatozoides en la trompa de Fallopio. Esta técnica es una forma de inseminación que acerca físicamente los gametos. Puede, por tanto, suponer una ayuda a la fecundación que no sustituye el engendrar natural, en cuanto que solamente aproxima los gametos permitiéndoles interactuar entre sí y activarse mutuamente. Sin embargo, en la actualidad su uso es muy limitado, a no ser que lo solicite expresamente la pareja, ya que es un procedimiento más caro y técnicamente más complicado que la de fecundación *in vitro*. Y sobre todo porque exige que los gametos tengan capacidad fecundante de suyo.

La fecundación *in vitro* de óvulos es una técnica de rutina en muchas clínicas de reproducción asistida³; miles de niños han nacido con este procedimiento técnico que sustituye al engendrar de los padres. La técnica se basa en los trabajos de Robert Edwards que permitieron la fecundación *in vitro* de óvulos madurados también *in vitro*⁴ y que llevó, pocos años más tarde, a conseguir el nacimiento de los primeros niños concebidos de esta forma⁵. La técnica consiste esencialmente en la obtención de óvulos me-

² Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, Hill JA, Mastroianni L, Buster JE, Nakajima ST, Vogel DL, Canfield RE (1999) Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *New England Journal of Medicine* 340, 177-83.

³ Braude PR (1987) Fertilization of human oocytes and culture of human pre-implantation embryos *in vitro*. En: *Mammalian Development. A Practical Approach*. M Monk (ed.), pp. 281-306, IRL Press, Oxford; Brinsden PR, Rainsbury PA, eds (1992) *A Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Parthenon Publishing Group, Carnforth, Lancs.

⁴ Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC (1969) Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 221, 632-635.

⁵ Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* ii, 366; Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term human pregnancies using embryos grown *in vitro*. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 87, 737-756.

dante la aspiración del contenido de los folículos ováricos, después de realizar una estimulación hormonal de la mujer. Lo óvulos se incuban *in vitro* en condiciones controladas, junto con espermatozoides. Los espermatozoides se preparan imitando las condiciones de la «capacitación» que experimentan en su paso por el tracto genital femenino. De esta forma pueden ser capaces de inducir la activación fisiológica del óvulo necesaria para la fecundación.

En 1992 nacían los primeros niños concebidos mediante el uso de la técnica de inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)⁶, que consiste en microinyectar un espermatozoide directamente en el citoplasma del óvulo, sin que se requiera la preparación fisiológica *in vitro* del espermatozoide. Ha resultado útil cuando el semen contiene pocos espermatozoides, o son inmóviles, incapaces de fecundar utilizando la técnica convencional.

Más tarde, en 1995, se ha conseguido el nacimiento de niños concebidos mediante microinyección de espermátidas redondas o elongadas⁷. También se usa la inyección en óvulos de espermatozoides secundarios⁸. Después de la inyección, tanto el núcleo del espermatozoide secundario como el núcleo del óvulo, completan su segunda división meiótica, se elimina un cuerpo polar y se forman pronúcleos masculino y femenino. Estas técnicas se emplean en clínica cuando no se encuentran espermatozoides maduros en el semen y solo pueden localizarse células inmaduras.

Por último, Kimura y col.⁹ han demostrado que en ratones es posible generar crías viables y fértiles mediante microinyección de núcleos de

⁶ Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 340, 17-18.

⁷ Tesarik J, Mendoza C, Testart J (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *The New England Journal of Medicine* 333, 525; Tesarik J, Rolet F, Brami C, Sedbon E, Thorel J, Tibi C, Thebault A (1996) Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction* 11, 780-783.

⁸ Sofikitis N, Mantzavinos T, Loutradis D, Yamamoto Y, Tarlatzis V, Miyagawa I (1998) Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *The Lancet* 351, 1177-1178.

⁹ Kimura Y, Tateno H, Handel MA, Yanagimachi R (1998) Factors affecting meiotic and developmental competence of primary spermatocyte nuclei injected into mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 59, 871-877.

espermatoцитos primarios; sin embargo, sólo el 3,8% de los óvulos microinyectados llegan a término debido probablemente a anomalías en la meiosis. Por este motivo se considera que aún no es aconsejable utilizar esta técnica en humanos.

Clonación reproductiva

Otras técnicas de reproducción asistida están relacionadas con la fecundación y el desarrollo temprano. Una de las aplicaciones potenciales de la clonación es su uso en algunos casos extremos de infertilidad por carencia de gametos. La transferencia de núcleo puede verse como un método no convencional de fecundación e iniciación del desarrollo. Aunque, después del nacimiento de la oveja Dolly ¹⁰, se ha logrado ya la clonación de individuos de una variedad de especies ¹¹, la clonación sigue siendo, de todos modos, una técnica aún no eficiente si consideramos que, en general, sólo un 0,2-5% de los oocitos a los que se ha realizado una transferencia de núcleo continúan su desarrollo. Se han planteado varias dudas acerca de la salud, envejecimiento prematuro o la fertilidad, de los individuos clonados, y existen datos que indican que hay una mortalidad perinatal mayor en los mamíferos clonados ¹².

Mortalidad embrionaria

Aunque los datos no permiten unas estadísticas muy precisas, es evidente que el porcentaje de embriones que detienen su desarrollo entre las etapas de cigoto y blastocisto es más elevada cuando la generación e ini-

¹⁰ Wilmut I, Schnieke E, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

¹¹ cf. Whitfield J (2001) Cloned cows in the pink Nature Science Update (<http://www.nature.com/nsu/>). Más información: Rosling Institute Online. <http://www.ri.bbsrc.ac.uk/library/research/cloning>.

¹² Kubiak JZ, Johnson MH (2001) Human infertility, reproductive cloning and nuclear transfer: a confusion of meaning. *BioEssays* 23, 359-364.



cio del desarrollo tiene lugar *in vitro*¹³ que *in vivo*. Esto demuestra que la «situación biológica primordial» es esencial ya para el desarrollo temprano del embrión.

Un estudio publicado en 1954 mostró que hasta un 30% de los embriones tienen interrumpido su desarrollo antes del estadio de blastocisto¹⁴. La causa mayor de pérdidas durante la gestación humana son las anomalías cromosómicas. La proporción de gestaciones de embriones con anomalía cromosómica decrece a lo largo del tiempo de gestación, desde un 5% a las 7 semanas¹⁵, hasta un 0,6% en recién nacidos¹⁶.

El análisis cromosómico de embriones humanos generados y cultivados *in vitro* ha puesto de manifiesto que hasta un 40% de ellos contienen anomalías cromosómicas¹⁷. Aproximadamente el 50% de los embriones preimplantatorios de 2 ó 4 células que se cultivan *in vitro* no llegan al estadio de blastocisto¹⁸. Además, sólo aproximadamente el 20% de los embriones de 4 células transferidos se implantan en útero¹⁹. Al menos tres causas podrían explicar esta detención del desarrollo: anomalías cromosómicas, defectos intrínsecos del oocito y del embrión preimplantatorio.

¹³ Hardy H, Handyside AH, Winston RML (1989) The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Development* 107, 597-604.

¹⁴ Hertig AT, Rock J, Adams EC, Menkin MC (1954) Thirty-four fertilised human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility. *Pediatrics* 23, 202-211.

¹⁵ Burgoyne PS, Holland K, Stephens R (1991) Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy estimation from induced and spontaneous abortion data. *Human Reproduction* 6, 555-565.

¹⁶ Evans JA, Canning N, Hunter AG, Martsolf JT, Ray M, Thompson DR, Hamerton JL (1978) A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. III. An analysis of the significance and cytologic behavior of the Robertsonian and reciprocal translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 20, 96-123.

¹⁷ Plachot M, de Grouchy J, Junca AM (1987) From oocyte to embryo: a model, deduced from *in vitro* fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities. *Annals of Genetics* 30, 22-32; Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility* 64, 382-391.

¹⁸ Hardy H, Handyside AH, Winston RML (1989) The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Development* 107, 597-604.

¹⁹ Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Winston RML, Birmane J, Englert Y (2000) Non-invasive assessment of glucose and pyruvate uptake by human embryos after ICSI and during the formation of pronuclei. *Fertility and Sterility* 73, 947-956.

Además hasta un 75% de los embriones humanos cultivados in vitro presentan fragmentación del citoplasma de sus células. La viabilidad de estos embriones tempranos está comprometida cuando esos fragmentos contienen proteínas que son esenciales para continuar con el desarrollo²⁰. Sin embargo, en ocasiones, la existencia de fragmentos no es letal y constituyen estructuras transitorias que desaparecen por reabsorción o lisis²¹. Se han identificado también anomalías tales como fragmentación nuclear²², y la existencia de células binucleadas o anucleadas, posiblemente originadas como un fallo de la división celular²³.

Recientemente se ha publicado que además de un mayor grado de malformaciones²⁴, se produce un aumento de secuelas neurológicas, como retraso mental y graves defectos de visión²⁵, en niños nacidos por aplicación de las técnicas de FIV respecto a los engendrados naturalmente. En resumen, la intervención técnica genera de suyo una tasa muy elevada de embriones no viables, con taras genéticas y alteraciones del desarrollo; esta tasa supera la mortalidad debida a pérdidas de embriones defectuosos engendrados en los primeros días de vida.

Analizaremos ahora las interacciones de los gametos entre sí, y con el medio propio donde se fecundan naturalmente, y posteriormente las interacciones del embrión temprano y la madre a lo largo del trayecto del

²⁰ Antczak M, Van Blerkom J (1999) Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Human Reproduction* 14, 429-447

²¹ Van Blerkom J, Davis P, Alexander S (2001) A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Human Reproduction* 16, 719-729.

²² Hardy K (1997) Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction* 3, 919-925.

²³ Hardy K, Warner A, Winston RML, Becker DL (1996) Expression of intercellular junction during preimplantation development of the human embryo. *Molecular Human Reproduction* 2, 621-632.

²⁴ Bergh T, Ericson A, Hillensjö T, Nygren KG, Wennerholm UB (1999) Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *The Lancet* 354, 1579-1585.

²⁵ Strömberg B, Dahiquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist (2002) Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *The Lancet* 359, 461-465.

embrión desde las trompas al útero. Son interacciones muy precisas que alteran el desarrollo inicial del embrión cuando no se dan.

La fecundación: el diálogo molecular de los gametos paterno y materno

A lo largo del proceso laborioso y armónico de fecundación, el material genético de ambos progenitores se prepara, se modifica estructural y químicamente, y se funden fragmentos de diferentes tipos de membranas del espermio y el óvulo para dar la membrana peculiar del cigoto. El cigoto, «embrión unicelular» es más que la fusión del gameto aportado por el padre y el aportado por la madre. Los diversos componentes del interior celular se ordenan de forma adecuada para la primera división, con la que arranca a vivir, convirtiéndose en embrión bicelular.

Para que la fecundación tenga éxito, los gametos masculino y femenino deben activarse mutuamente. Y para ser capaces de establecer este diálogo molecular, por el que se activan mutuamente, ambas células deben estar en una condiciones adecuadas de maduración. Los estudios de biología del desarrollo manifiestan la enorme complejidad de estos procesos, destacando su carácter continuo: cada estadio comienza y es dependiente de dónde acaba el anterior. Así pues, la fecundación, que comprende la unión de gametos haploides masculino y femenino y la generación de un cigoto diploide, es, a su vez, la culminación de una serie de pasos regulados delicadamente que tiene como objeto poner a ambos gametos en contacto²⁶. Para ello es esencial una característica fundamental de los gametos: éstos deben encontrarse en un estado de represión de su actividad; y además, estar bloqueados de tal manera que la inhibición de cada uno sea eliminada por la otra célula²⁷. En segundo lugar los gametos han de ser capaces de encontrarse y activarse mutuamente. El éxito de la fecundación —es decir, un desarrollo embrionario adecuado de un cigoto real— depende de que esta activación se produzca siguiendo las etapas apropiadas de modo ordenado.

²⁶ Wassarman P, ed. (1991) *Elements of Mammalian Fertilization*. CRC Press, Boca Raton; Yanagimachi R (1994) En: *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition (E Knobil, J Neill, eds). Raven Press, New York, págs. 189-317.

²⁷ Boveri, T. (1902) *Das Problem der Befruchtung*. Gustav Fischer Verlag, Jena.

Biología de la maduración de los gametos

Los espermatozoides son células muy diferenciadas, pequeñas y móviles, con la función de nadar, encontrar al óvulo y fecundarlo. Están compartimentados con dos estructuras principales: cabeza y flagelo. La cabeza posee el núcleo haploide de cromatina condensada, resultado final de la división meiótica, y un gránulo secretor, el acrosoma, que se encuentra en la región apical entre el núcleo y la membrana plasmática; las enzimas que se localizan en el acrosoma ayudan al espermatozoide a penetrar las cubiertas extracelulares del óvulo. El flagelo contiene las mitocondrias, que producen la energía necesaria para la motilidad, y el axonema²⁸.

Los óvulos son células inmóviles y de mayor tamaño que almacenan elementos nutritivos y moléculas que van a ser usadas durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Al contrario de lo que sucede con el espermatozoide, el óvulo, cuando es liberado del ovario, no ha completado la meiosis sino que se encuentra en la metafase de la segunda división. La cubierta del óvulo es una matriz extracelular, zona pelúcida, que es un complejo de glicoproteínas secretadas por el oocito. Por fuera de la zona pelúcida se localizan células derivadas de la granulosa del folículo ovárico. El conjunto de estas células se denomina *cumulus oophorus* y se encuentra bañado por una matriz secretada por ellas²⁹.

Durante el proceso de espermatogénesis, las espermatogonias (células primitivas de la línea germinal) darán origen a los espermatozoides, pasando por estados celulares intermedios. El espermatocito primario experimenta la primera de las dos divisiones meióticas y origina dos espermatocitos secundarios. Y cada uno de los espermatocitos secundarios experimenta una segunda división meiótica y origina dos espermátidas. La espermátida es la célula haploide que resulta de la segunda división meiótica y experimenta una diferenciación terminal hacia el espermatozoide, una célula haploide madura y diferenciada.

²⁸ Yanagimachi R (1994) En: *The Physiology of Reproduction*, 2a. edición (E Knobil, J Neill, eds). Raven Press, New York, págs. 189-317.

²⁹ Edwards RG (1980) *Conception in the Human Female*. Academic Press, London: Wassarman P (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* 57, 415-442; Gilbert SF (2000) *Developmental Biology*, 6th edition, Sinauer, Sunderland MA.

Las células de la línea femenina pasan también por distintas etapas en el proceso de producción de óvulos (oogénesis u ovogénesis): oogonia, oocito primario y oocito secundario. El término «oocito» define la etapa de la meiosis en que se encuentran las células de la línea femenina y se suele utilizar el término «óvulo» para referirse al gameto femenino que se libera durante la ovulación. La ovulación, por lo tanto, puede describirse como la liberación del gameto femenino (óvulo), generalmente en estadio de oocito secundario, que se encuentra preparado para la fecundación.

El oocito es capaz de ser fecundado inmediatamente después de ser liberado por el ovario. Sin embargo, el espermatozoide tiene que experimentar una larga serie de procesos de «maduración» después de ser producido en el testículo³⁰. Esta maduración tiene lugar en las vías eferentes del tracto genital masculino; involucra cambios relacionados con la adquisición de capacidad de movimiento, alteraciones tanto en la membrana plasmática como en la estructura de orgánulos celulares, y la estabilización de la cromatina y de los componentes del flagelo³¹. Una vez eyaculados los espermatozoides son aún incapaces de fecundar un óvulo; deben residir cierto tiempo en el tracto genital femenino, para que se produzcan los cambios que reciben colectivamente el nombre de «capacitación», pues dan al espermatozoide la capacidad de fecundar³².

Posteriormente tienen que nadar activamente para atravesar la unión entre útero y oviducto³³ y aquellos que atraviesan esta última barrera se

³⁰ Yanagimachi R (1994) En: *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition (E Knobil, J Neill, eds). Raven Press, New York, págs. 189-317; Yanagimachi R (2001) Gamete manipulation for development: new methods for conception. *Reproduction Fertility and Development* 13, 3-14.

³¹ Yanagimachi R (1994) En: *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition (E Knobil, J Neill, eds). Raven Press, New York, págs. 189-317.

³² Austin CR (1985) En: *Biology of Fertilization* (CB Metz, A Monroy, eds). Academic Press, New York, vol. 2, pp. 121-155.; Florman HM, Babcock DF (1991) En: *Elements of Mammalian Fertilization* (P Wassarman, ed). CRC Press, Boca Raton, págs. 105-132; Yanagimachi R (1994) En: *The Physiology of Reproduction*, 2a. edición (E Knobil, J Neill, eds). Raven Press, New York, págs. 189-317.

³³ Katz DF, Drobnis E (1990) En: *Fertilization in Mammals* (BD Bavister, J Cummins, ERS Roldan, eds), Serono Symposia, Norwell, MA, pp. 125-137; Suarez S, Drost M, Redfern K, Gottlieb W (1990) En: *Fertilization in Mammals* (BD Bavister, J Cummins, ERS Roldan, eds), Serono Symposia, Norwell, MA, págs. 111-124.

vuelven temporalmente inactivos una vez que llegan a la porción inferior del istmo del oviducto³⁴. Durante este período de residencia en el istmo inferior, los espermatozoides se adhieren a la mucosa de la pared del oviducto a través de la región acrosómica y aquellos que no se adhieren mueren o pierden su capacidad fecundante³⁵. Alrededor del momento de la ovulación, ya sea en respuesta a señales derivadas del óvulo, o a hormonas esteroides transportadas por el sistema de contracorriente ovario-uterino, los espermatozoides experimentan el proceso final de maduración: la «capacitación»; se desprenden de la pared del oviducto y comienzan a nadar activamente hacia el óvulo. Sólo una pequeña fracción de los espermatozoides que continúan con su migración³⁶, cambian el patrón de motilidad, volviéndose mucho más activos³⁷. Los primeros espermatozoides que llegan a las cercanías del óvulo son aquellos que tienen más probabilidades de fecundarlo. El tracto femenino representa, por lo tanto, un fuerte filtro y barrera para los espermatozoides. De los 200 millones, la mayoría mueren o son fagocitados antes de llegar a la vecindad del óvulo; unos miles de espermatozoides llegan al istmo del oviducto; y sólo de 2 a 20 llegan al sitio de la fecundación³⁸. Esta drástica reducción implica una selección muy intensa del gameto masculino en el tracto femenino y que conlleva la capacitación.

La capacitación prepara la capacidad fecundante del espermio en tres factores fundamentales: a) desarrolla cambios en el patrón de motilidad de los espermatozoides; b) le permite penetrar la cubierta celular del óvu-

³⁴ Smith TT, Koyanagi F, Yanagimachi R (1987) Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination. *Biol. Reprod.* 37, 225-234

³⁵ Smith TT, Yanagimachi R (1990) The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol. Reprod.* 42, 450-457.; Suarez S, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.* 44, 375-381.

³⁶ Smith TT, Yanagimachi R (1991) Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J. Reprod. Fert.* 91, 567-573.

³⁷ Suarez S, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL (1991) Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol. Reprod.* 44, 375-381.

³⁸ Suarez S, Drost M, Redfern K, Gottlieb W (1990) En: *Fertilization in Mammals* (BD Bavister, J Cummins, ERS Roldan, eds), Serono Symposia, Norwell, MA, pp. 111-124.

lo, y c) le confiere la capacidad de responder a ligandos del óvulo con una activación (la llamada «reacción acrosómica»). El sentido biológico de esta etapa es claro: los componentes moleculares del tracto genital femenino ofrecen una fuerte barrera natural al avance de los gametos masculinos de tal modo que se seleccionan los de mayor capacidad de fecundar de manera correcta, esto es, de engendrar un embrión con posibilidad de un desarrollo adecuado.

Una primera conclusión es que la viabilidad, salud y buena conformación natural del embrión generado disminuye drásticamente cuando los gametos paternos deficientes (con bajo potencial fecundante por algún tipo de anomalía, o por ser inmaduros) se utiliza en las técnicas de reproducción asistida forzando la fecundación del óvulo. La gama de acciones que van desde:

- a) ayudar al encuentro de los gametos y que por si mismos se fecunden mutuamente
 - b) sustituir el proceso de fecundación por una forzada incorporación al óvulo de espermatozoides sin capacidad fecundante, inmaduros
 - c) inyectar directamente el material genético paterno en el óvulo
- sigue la línea: inseminación, GIFT, FIV, ICSI, inyección de gametos inmaduros, transferencia de material genético.

Es decir, el cigoto podría ser bien constituido desde el punto de vista biológico en un proceso de fecundación que se limitara a «acercar» los gametos masculinos, concentrados y capacitados previamente, a un óvulo maduro en un medio de cultivo que imita las condiciones fisiológicas de las trompas uterinas. De esta forma sólo los gametos dotados genéticamente de manera correcta, podrían producir una correcta fecundación. La práctica clínica es, habitualmente, mucho más agresiva para suplir la ineficiencia natural.

A su vez, un incremento marcado en los niveles de la hormona femenina LH desencadena la ovulación hacia la mitad del ciclo menstrual. La ovulación resulta en la expulsión de fluido contenido en el interior del folículo y del oocito rodeado de la zona pelúcida y células foliculares hacia la cavidad peritoneal. El primer paso en el transporte del óvulo es la «captura» del mismo por las fimbrias del oviducto. Mientras el óvulo se encuentra en el oviducto, se halla bañado por el fluido tubárico. La fecundación eficaz es un proceso que exige unas condiciones sumamente preci-

sas; una de las principales se refiere al estado de maduración del óvulo: la que conlleva un ciclo natural. Es conocido que, para aumentar la eficacia de las técnicas de fecundación asistida, se suele inducir una multiovulación. Un estudio reciente demuestra que los embriones humanos originados por fecundación de óvulos que proceden de una multiovulación tienen más dificultad para anidar y, los que lo consiguen se desarrollan con más malformaciones que los originados por fecundación del óvulo madurado de forma natural en un ciclo menstrual; más aún, la madre por efectos del fármaco que se usa en estos casos, aporta un microentorno que es muy agresivo para el embrión que trata de anidar.

Puesto que en general en las clínicas de reproducción asistida se practica la multiovulación, además de la fusión forzada de los gametos (especialmente por inyección directa del espermio dentro del óvulo), se comprende que la viabilidad del embrión producido sea siempre mucho menor que la del engendrado, en tanto que el óvulo fecundado no es maduro³⁹.

Fecundación: Interacción y reconocimiento espermatozoide-óvulo

Una vez que el gameto masculino es atraído hacia las trompas uterinas y capacitado (es decir «limpiado» de los componentes que ocultan los receptores de reconocimiento del óvulo) se produce el reconocimiento específico en el tracto genital femenino, entre el espermio, maduro y capacitado, y el óvulo maduro, a través de proteínas presentes en la zona pelúcida, o *cumulus oophorus* (la cubierta que rodea al óvulo), y las presentes en la membrana externa de la cabeza del espermio. Los espermatozoides son entonces capaces de penetrar el *cumulus oophorus*. En condiciones naturales la relación entre espermatozoide y óvulo es habitualmente en la proporción 1:1 (o de unos pocos espermatozoides por óvulo). Sólo en condiciones de fecundación *in vitro* existe una proporción de muchos espermatozoides por cada óvulo.

³⁹ Moore P, (2001) Natural cycle IVF should be used more frequently *BMJ* 322, 318-319(cfr. Nargund G (2001) *Human Reproduction* 16, 221-225.

La «reacción acrosómica»

La reacción acrosómica del espermatozoide es un proceso de secreción de las enzimas contenidas en el acrosoma que se localiza por encima del núcleo del espermatozoide. La exocitosis del acrosoma es un proceso crucial, ya que es esencial para que el espermatozoide pueda penetrar las cubiertas del oocito y sea capaz de fusionarse con la membrana plasmática del oocito. La exocitosis del acrosoma involucra una serie de cambios moleculares que culmina con la fusión de la membrana externa del acrosoma y la membrana plasmática que se encuentra por encima de ésta última, lo cual da lugar a la formación de poros que permiten la liberación de las enzimas contenidas en el gránulo acrosómico, capaces de ir abriendo un canal en la trama de la zona pelúcida del óvulo, y de esta forma avanzar por ella.

Una de las glicoproteína de la zona pelúcida (conocida como ZP3) es la que cumpliría este papel de iniciar la exocitosis, comportándose como ligando del receptor del espermio. Por otra parte se ha demostrado que la progesterona, que se encuentra presente en la matriz del *cumulus oophorus*, estimula la exocitosis⁴⁰.

Penetración del espermatozoide y fusión espermatozoide-óvulo

Una vez que atraviesa la zona pelúcida, el espermatozoide recorre rápidamente el espacio perivitelino. La cabeza del espermatozoide se une a la membrana plasmática del oocito. A continuación la región posterior de la cabeza espermática y el flagelo se incorporan mediante fusión de membranas, mientras que la porción anterior de la cabeza se engloba en un proceso de tipo fagocítico⁴¹.

⁴⁰ Thomas P, Meizel S (1989) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 264, 539-546.

⁴¹ Yanagimachi R (1994) En: *The Physiology of Reproduction*, 2a. edición (E Knobil, J Neill, eds). Raven Press, New York, págs. 189-317.

Activación del oocito y exocitosis de gránulos corticales

Una vez que se produce la fusión con el espermatozoide, el óvulo inicia una serie de procesos morfológicos y bioquímicos que conducen a la primera división celular y diferenciación. Este acontecimiento se conoce como activación del oocito y consta de dos eventos: la exocitosis de los gránulos corticales y la continuación de la meiosis.

A nivel molecular, la activación de los oocitos involucra la activación de una serie de mecanismos de señalización intracelular; destaca, entre ellos, una serie de cambios tempranos relacionados con procesos de hiperpolarización y de incrementos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} que son fundamentales para la exocitosis de los gránulos corticales y para el reinicio del ciclo celular. Se ha sugerido la existencia de un factor, o grupo de factores, insolubles presentes en la región perinuclear del espermatozoide⁴², capaces de producir el aumento local de calcio. 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. Se producen a continuación picos transitorios en los niveles de Ca^{2+} a intervalos regulares que duran hasta el momento en que se visualizan los pronúcleos⁴³.

El sitio por el que penetra el espermatozoide parece ser importante para la polaridad que se observa durante el desarrollo embrionario temprano⁴⁴ y por tanto estas oscilaciones de Ca^{2+} pueden ser fundamentales para etapas del desarrollo posteriores. Las oscilaciones de Ca^{2+} durante el

⁴² Perry, ACF, Wakayama T, Cooke IM, Yanagimachi R (2000) Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients. *Developmental Biology* 217, 386-393

⁴³ Miyazaki S (1989) Signal transduction of sperm-egg interaction causing periodic calcium transients in hamster eggs. En: *Mechanisms of Egg Activation*. R Nucitelli, ed., pp. 231-246. Plenum Press, New York; Jones KT, Carroll J, Merriman JA, Whittingham DG et. (1995) Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development* 121, 3259-3266; Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N, Kuwabara Y, et al., (1997) Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 1087-1093.

⁴⁴ Piotroska K, Zernicka-Goetz M (2001) Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409, 517-521.

proceso de activación del oocito influyen sobre los procesos que tienen lugar varios días más tarde en el desarrollo ⁴⁵.

En condiciones fisiológicas, solo un espermatozoide se fusiona con la membrana y penetra dentro del oocito. La entrada del espermatozoide desencadena la exocitosis de los gránulos corticales y la mayor parte de los gránulos se ha eliminado en los siguientes 5 minutos. La principal función de la exocitosis del contenido de los gránulos corticales es la de modificar las cubiertas del oocito y evitar la fecundación polispérmica, es decir, la entrada de más de un espermatozoide). En la especie humana, el bloqueo a la polispermia se debe principalmente a una reacción química en la zona interna de la zona pelúcida ⁴⁶.

En conclusión, una de las causas posibles del fenómeno de polispermia, que origina, durante la fecundación *in vitro*, un cigoto inviable es la exocitosis retrasada de los gránulos corticales y por tanto una reacción más lenta en la zona. Causas posibles de la polispermia pueden ser también una inmadurez del óvulo en el momento de la penetración del espermatozoide, un envejecimiento excesivo del óvulo y defectos en la zona pelúcida.

Destino de las estructuras espermáticas

Las mitocondrias del espermatozoide se incorporan al oocito y son capaces de transcribir el material genético, pero degeneran rápidamente. Cada espermatozoide posee de 50 a 75 mitocondrias, con una copia de ADN mitocondrial (ADNmt) cada una, mientras que el oocito humano contiene aproximadamente 100.000 copias de ADNmt. En embriones humanos se ha identificado la presencia de mitocondrias de la pieza intermedia

⁴⁵ Ozil JP (1990) The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 109, 117-127; Vitullo AD, Ozil JP (1992) Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Developmental Biology* 151, 128-136; Ozil JP, Huneau D (2001) Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca²⁺ signal regime on development. *Development* 128, 917-28.

⁴⁶ Sathananthan AH, Trounson AO (1985) The human pronuclear ovum: fine structure of monospermic and polyspermic fertilization *in vitro*. *Gamete Research* 12, 385-398.

del espermatozoide al menos hasta el estadio de mórula⁴⁷. El ADNmt paterno se pierde a través de un proceso de destrucción que tiene lugar durante las primeras etapas de desarrollo⁴⁸.

Este proceso de eliminación es importante en el contexto de técnicas de microinyección de espermatozoides (ICSI), ya que se alteran los procesos de incorporación y destrucción de mitocondrias en el óvulo y primeros estadios de desarrollo.

Descondensación del espermatozoide y formación de pronúcleos

El oocito, que se encontraba detenido en metafase de la segunda división meiótica (metafase II) antes de la fecundación, completa la meiosis después de la fusión con el espermatozoide y elimina el segundo corpúsculo polar. El complemento haploide del oocito se transforma a continuación en el pronúcleo femenino. La cromatina del pronúcleo materno comienza a programarse de acuerdo con la estructura y química propia de un mensaje genético que va a empezar una nueva emisión del mensaje; esto es, va perdiendo ya la «impronta» propia de gameto materno, durante el mismo proceso de fecundación⁴⁹.

Mientras tanto, el núcleo del espermatozoide se descondensa y se transforma en el pronúcleo masculino, quedando el DNA en situación de poder expresar la información genética. El núcleo del espermatozoide está muy condensado cuando penetra en el oocito, y su transformación a pronúcleo masculino representa un proceso previo de preparación para el desarrollo del embrión. Este proceso de maduración del pronúcleo masculino está controlado por el oocito, a través de diversos factores. En primer lugar produce la descondensación de la cromatina de la cabeza del espermatozoide

⁴⁷ Ankel-Simons F, Cummins JM (1996) Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 13859-13863.

⁴⁸ Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371-372.

⁴⁹ Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414, 122-128.

y de su envoltura nuclear, con reducción de los puentes disulfuro de las protaminas. Después se rehace la envoltura nuclear y se reorganiza la cromatina, con incorporación de histonas. Posteriormente el pronúcleo entra en la fase S del ciclo, en la que se produce la replicación del ADN. Posteriormente, los cromosomas se integran en el huso con los cromosomas del oocito en la que es ya la primera división del desarrollo para dar el embrión bicelular⁵⁰.

Varias horas después de la fusión espermatozoide-oocito comienza la síntesis de ADN en ambos pronúcleos. El pronúcleo paterno atrae al materno y se mezclan y organizan en una unidad desplazándose hacia el centro del cigoto. Mientras los pronúcleos se aproximan, sus membranas nucleares se desintegran y sus cromosomas se mezclan antes de la primera división mitótica. Los dos pronúcleos son ya el núcleo que porta el patrimonio genético del hijo. La mezcla de los cromosomas y su preparación para dar lugar a la primera división celular puede ser considerada como el final de la fecundación y el comienzo del desarrollo embrionario.

El encuentro, preparación y fusión de los pronúcleos paterno y materno es un lento proceso perfectamente acompasado en el tiempo y en el espacio. El DNA de cada pronúcleo está estructurado, y con la impronta parental, materna o paterna específica y propia de células germinales. La elevación local del calcio constituye la base molecular del control de las siguientes etapas: el calcio hará que se formen filamentos contráctiles en dicha zona que tiran hacia dentro del núcleo del gameto paterno. A la vez el calcio pone en marcha la síntesis de proteínas, que hasta ese momento estaba detenida en el óvulo maduro, y ese mismo ion calcio organiza los pronúcleos paterno y materno.

La dificultad de que la fecundación «forzada» dé lugar a un cigoto perfectamente polarizado, es una llamada de atención a la práctica clínica de FIV: se producen embriones que no tienen las condiciones ambientales requeridas para constituirse y desarrollarse con normalidad. Por el contrario un embrión engendrado, en su entorno natural tiene más probabilidad de sobrevivir y desarrollarse. De hecho se conoce desde hace tiempo que

⁵⁰ Tesarik J Kopečný V (1989) Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Research* 24, 135-149.

los abortos tempranos espontáneos son mayoritariamente de embriones con malformaciones, y muy raramente son embriones bien formados.

En resumen, las anomalías que influyen sobre el desarrollo se producen ya en el momento de la fecundación, y en alguna ocasiones los cigotos resultantes no progresan mucho más allá del estadio de una célula. La aparición de los pronúcleos masculino y femenino significa que se han producido las primeras etapas de la fecundación. La entrada en singamia y el desarrollo posterior pueden estar afectadas por problemas relacionados con:

- a) la incorporación del espermatozoide⁵¹;

- b) el desarrollo y alineación de los pronúcleos y la iniciación de la singamia⁵²;

- c) una desigualdad del tamaño de los pronúcleos que puede estar asociada con una inmadurez del citoplasma del oocito⁵³.

- d) la migración de los pronúcleos masculino y femenino hacia el centro del óvulo fecundado y su unión, que están relacionadas con cambios en los sistemas citoesqueléticos. Los microtúbulos del óvulo son esenciales para la división celular y la formación y migración del pronúcleo. Por otra parte, el espermatozoide fecundante porta su centrosoma al interior del óvulo⁵⁴ y se constituye en el centrosoma del cigoto cuando incorpora proteínas del óvulo.

- e) Los cigotos en estadio de pronúcleo tienen actividad de traducción y sintetizan nuevas proteínas, tal vez utilizando RNAm almacenado en el gameto materno. Una serie de proteínas se sintetiza durante el estadio

⁵¹ Asch R, Simerly C, Ord VA, Schatten G (1995) The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Human Reproduction* 10, 1897-1906.

⁵² Van Blerkom J (1996) Sperm centrosome dysfunction: a possible new class of male factor infertility in the human. *Molecular Human Reproduction* 2, 349-354.

⁵³ Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J (1998) Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 6, 137-141.

⁵⁴ Sathanathan AH, Kola I, Osborne J, Trounson A, Bongso A, Ratnam SS (1991) Centrioles in the beginning of human development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88, 4806-4810; Simerly C, Wu GJ, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, Navara C, Gerrity M, Rinehart J, Binor Z, Asch R, Schatten G (1995) The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans and the implications for infertility. *Nature Medicine* 1, 47-53.

pronuclear⁵⁵, algunas de las cuales en forma transitoria durante unas pocas horas después de la fusión espermatozoide-ooocito. Algunas otras pueden aparecer pocas horas después de la fecundación. La función de estas proteínas no está clara aún pero puede estar relacionada con el inicio de la mitosis del cigoto. La transición del control materno de la transcripción al control cigótico se produce en humanos en el paso de 4 a 8 células⁵⁶.

En la fecundación el material genético aportado por los gametos paterno y materno se encuentra en el estado adecuado: tanto el espermio como el óvulo han sufrido la correspondiente gametogénesis, y tanto las membranas, como los pronúcleos son capaces de dar las diferentes etapas que conducen a la constitución del cigoto.

Por tanto, el cigoto, que se forma en la fecundación «espontánea» de un óvulo maduro por un espermio, está perfectamente organizado y así la primera división para dar el embrión de dos células se produce según un plano fijo. La entrada forzada del espermio, o la inmadurez del óvulo, puede dar lugar a que el cigoto resultante no esté correctamente organizado para dar la primera división a embrión de dos células.

Impronta paterna y materna en la construcción del embrión.

Los gametos, las células que aportan padre y madre para la generación del cigoto, son portadoras cada una de ellas, de una mitad de la dotación genética. Con la fecundación se completa, mediante la aportación de ambos progenitores, el patrimonio hereditario propio de un individuo de esa especie. Los 22 autosomas humanos procedentes del padre, y los 22 procedentes de la madre no intervienen en la determinación sexual.

Sin embargo, dentro de cada nuevo par que se constituye en el cigoto, el cromosoma que viene del padre mantiene sus diferencias en relación con el que procede de la madre, y esas diferencias determinan también

⁵⁵ Howlett SK, Bolton VN (1985) Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 87, 175-206.

⁵⁶ Braude P, Bolton V, Moore S (1988) Human gene expression first occurs between the four— and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332, 459-461.

que cada uno contribuya, con sus peculiaridades, al desarrollo del embrión. La naturaleza de esa impronta se ha ido conociendo con cierto detalle en estos últimos años. Sobre el mensaje genético escrito en clave de cuatro letras las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las pirimidínicas citosina (C) y timina (T) cada cromosoma tiene la posibilidad de modificar algunas de las citosinas mediante un pequeño cambio químico, la introducción de un grupo metilo en su molécula. El patrón de metilación, el número y la posición que ocupan esas citosinas metiladas, es característico de cada cromosoma y diferente para cada uno de ellos, según proceda del padre o de la madre. Se introducen así cambios en el flujo de instrucciones al cerrar, generalmente, marcos de lectura del mensaje, impidiendo la expresión de genes situados en el cromosoma después de esas zonas marcadas. El patrón de metilación de los distintos cromosomas contribuye a que cada célula del organismo adquiera la identidad biológica como célula de hígado, de riñón, o de pulmón. La distribución estratégica de estas citosinas etiquetadas condicionará que se expliciten o no instrucciones específicas para la síntesis de los componentes propios de cada tipo celular.

El fenómeno de la impronta parental tiene un claro significado biológico. Define la identidad biológica del cigoto originado por la fusión de los dos gametos, como embrión, diferente de cualquier célula híbrida originada por fusión de los núcleos de otras dos células cualesquiera; y netamente diferente también de la célula producida por fusión entre sí de dos óvulos, o de dos espermatozoides. Existe en los mamíferos una barrera biológica natural infranqueable, que echa por tierra la posibilidad de que nazca un hijo de un padre sin una madre, o de una madre sin un padre. La impronta masculina y la impronta femenina de la dotación genética que consigo llevan los 22 autosomas de los gametos, óvulo y espermatozoide, reafirman la vinculación heterosexual en el origen de todo hombre o mujer. Cuando el embrión se genera por transferencia de un núcleo de una célula somática a un óvulo requiere una serie de manipulaciones para «reprogramarlo» y que llegue a ser un cigoto⁵⁷.

⁵⁷ Santiago E (1977) Impronta paterna e impronta materna. *Temas 3 Investigación y Ciencia* 32-33

El proceso de fecundación tiene pues implicaciones importantes en el desarrollo. La formación de un embrión unicelular por transferencia de núcleos exige «reprogramación» (desdiferenciación o rejuvenecimiento) del código genético de la célula que aporta el núcleo para adquirir la «impronta» parental propia de cigoto, lo cual no es un proceso sencillo. La frecuencia de muertes en fase embrionaria y las anomalías que presentan los embriones obtenidos mediante transferencia de un núcleo se debe a que el DNA, por su situación, sufre un proceso anormal de metilación y desmetilación en las primeras etapas⁵⁸.

Diálogo molecular madre-hijo en la primera semana de vida

La ayuda materna a la tarea de crecer del embrión

La construcción del organismo se inicia con una etapa de crecimiento (multiplicación del número de células por división de cada una en dos), que tiene perfectamente acompasada su velocidad con la velocidad de aparición de componentes específicos de las membranas celulares del embrión de dos, tre, cuatro, ocho células, etc. El reconocimiento y la interacción específica de estos componentes mantienen las células resultantes de la multiplicación unidas en un conjunto no sólo físico sino también funcional; es decir, ese conjunto constituye una unidad orgánica, y no un simple conglomerado celular.

El dinamismo propio de la emisión del mensaje configura la materia en este estadio sincronizando de crecimiento y organización multicelular. La activación inicial (fundamentalmente producida por la elevación de calcio en el citoplasma del cigoto) «libera» o desbloquea la información contenida en él. A su vez, la interacción célula-célula activa las señales intracelulares modificando el estado del genoma: *informan* a cada de las células de su identidad como parte de un todo, bicelular, tetracelular, y así sucesivamente.

⁵⁸ Han, Yong— Manh, Abnormalities found in the DNA of cloned embryos explain why so many die. *Nature Genetics*, vol 28, p. 173, 2001

Hasta el estadio de 8 células los blastómeros conforman un grupo de células asociadas. Sin embargo, a partir de la tercera división, los blastómeros realizan al máximo sus contactos entre ellos formando un grupo compacto de células mantenido por uniones estrechas. Este proceso, conocido como *compactación*, separa una serie de células que se sitúan en el interior y que se comunican entre sí, de otras células que se disponen exteriormente. Aproximadamente 3 días después de la fecundación, las células del embrión compactado se dividen otra vez para formar una mórula de 16 células. Las células internas de la mórula constituyen la *masa celular interna* (MCI), y las células que rodean a éstas constituyen la *masa celular externa*. Las células de la MCI dan origen a tejidos del embrión propiamente dicho, y las células externas forman el *trofoblasto*, que más tarde contribuye a la placenta.

Es significativo que la segunda división, la de cada uno de estos blastómeros no se realiza de manera exactamente simultánea en el tiempo. Hay un estadio de tres células y las procedentes del primer blastómero se colocan hacia el interior de la mórula y serán las células de la masa interna del blastocisto⁵⁹.

A la vez que se van produciendo estas divisiones, comienzan a aparecer ordenadamente glicoesfingolípidos y glicoproteínas de membrana que mantiene el orden celular y señalan a la célula la posición que ocupa en el embrión bi, tetra, u octocelular y estableciendo los ejes del embrión. Con las primeras divisiones se forma la mórula. Se constituye como un mosaico de células que pueden distinguirse por diversos marcadores que señalan el destino que seguirán después; así, no es cuestión de azar entrar a formar parte de la zona interna o externa del embrión de 8 o de 14 células, o más tarde de la masa celular interna, o del trofoblasto del blastocisto. Además de los «pegamentos» específicos de las diferentes etapas en las membranas celulares, la asimetría ya presente en la primera división, y la diferente velocidad de la segunda división (que dará el embrión tricelular) y de la tercera división (que dará el embrión tetracelular) hace que cada célula tenga una historia diferente (espacial y temporal) y una polarización diversa.

⁵⁹ Piotrowska K, Zernica-Goetz M Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 409, 517521, 2001

Estos puntos son clave para un crecimiento orgánico y hacen que el embrión temprano no sea un tejido homogéneo e indiferenciado. Las células resultantes de esas primeras divisiones del cigoto no son un simple amasijo de células vivas, semejantes entre sí y semejantes al cigoto, y dotadas cada una de la misma individualidad que éste. A diferencia de lo que sería un grupo de células vivas encerradas bajo una cubierta esférica, sin más relación entre sí que la mera cercanía física, las células del embrión temprano constituyen una única realidad biológica y forman ya un elementalísimo organismo⁶⁰.

A esa unidad se añade el hecho de que las células están comunicadas entre sí. Las uniones que «pegan» las células hacen que cada una de éstas sintetice y mantenga en su interior señales moleculares que les dan noticia a cada una de la presencia de las otras y les indican además cómo seguir adelante. Los «pegamentos», algunos de ellos ausentes por completo en las células germinales de sus progenitores, aparecen en un momento preciso, y desaparecen después, también en un momento preciso. Puede decirse que el embrión en este periodo tan temprano de la vida (de unos seis días (sólo tiene que ocuparse de seguir estas instrucciones. La madre acumuló en el óvulo alimentos y energía que permitirán al embrión vivir, mientras recorre el largo camino del oviducto que va del extremo superior de la trompa, donde habitualmente comienza su vida, hasta el útero, donde se implantará para seguir recibiendo ayuda hasta estar en condiciones de nacer.

Durante las primeras etapas de desarrollo el embrión tiene un tamaño de 0,1-0,15 mm. En este periodo inicial vivir es fundamentalmente crecer: no en el sentido de aumentar de tamaño, cosa que no podría hacer por estar rodeado de una especie de caparazón (la zona pelúcida que rodeaba al óvulo del que procede) sino multiplicando el número de células por divisiones sucesivas que inicia la primera, el cigoto. En esta proliferación celular cooperan tanto el embrión como la madre. Tras la primera división, y una vez que las moléculas de adhesión dejan bien «pegadas» las

⁶⁰ López-Moratalla N, (1997) Biología del desarrollo. *Investigación y Ciencia*, abril, 34-35; López-Moratalla N La construcción de un ser vivo (1997) *Temas 3 Investigación y Ciencia*, 2-15.

dos primeras células, éstas reciben instrucciones para elaborar otra molécula concreta, la de un receptor, que sitúan en la membrana. Este receptor reconoce, y capta, una molécula de elaboración materna, un factor de crecimiento que insta a una nueva división. Sintetizan este factor de crecimiento las células maternas, primero las de las trompas, y después las del útero, promoviendo en este caso la multiplicación de las células de la masa interna del embrión ya en fase de blastocisto anidado.

La fecundación artificial priva al embrión de varios días de las ventajas del entorno materno, disminuyendo por ello su capacidad de sobrevivencia.

Otra tarea del embrión temprano: establecer con una primera diferenciación celular el tejido extraembrionario

El genoma del embrión se activa ya en el cigoto, comienza la expresión de sus genes, sincronizando el crecimiento del todo orgánico con la emisión diferencial del mensaje. Esto es, las células polares situadas en el exterior de la mórula se configuran como tejido extraembrionario: la cubierta que le permitirá el intercambio de materia, energía y señales moleculares para el crecimiento armónico con el exterior y además como primera barrera de defensa en la vida en simbiosis que iniciara con la anidación.

Así con la llegada a «blastocisto» aparecen ya dos tejidos diferenciados: el trofoblasto epidérmico que funcionará como «envoltura embrionaria» y la masa interna que dará lugar posteriormente a los tres tejidos embrionarios. El trofoblasto no es sólo un tejido «extraembrionario» sino que dará lugar a la placenta, necesaria e imprescindible para la comunicación con la madre en la gestación. Es un componente del sistema inmunitario innato con un papel esencial en la defensa frente a infecciones bacterianas durante la vida intrauterina⁶¹.

Pues bien, para alcanzar esta primera diferenciación celular, el cigoto debe utilizar muy pronto en el desarrollo, los productos de los genes. A pesar de que en el embrión humano la transcripción del genoma embrionario parece más marcada a partir del estadio de 8 células, existen datos

⁶¹ Guleria I y Pollard, J.D. «The trophoblast is a component of the immune system during pregnancy» *Nature Medicine* 6, 2000, 589-593.

que indican que se produce síntesis de RNA a partir del estadio cigoto⁶². En el estadio de 8 células algunos blastómeros tienen niveles elevados de síntesis de RNA, mientras que otros blastómeros muestran aún el patrón de los blastómeros de embriones de 4 células.

Preparando el reconocimiento del padre: segunda semana de vida

La anidación en el útero materno

En los cuatro o cinco primeros días de vida, mientras el embrión, blastocisto, se mueve a lo largo del oviducto hacia el útero, se expande dentro de la zona pelúcida. Durante esta etapa, la zona pelúcida evita que el blastocisto se adhiera a la pared del oviducto. Cuando el embrión llega al útero, debe «eclosionar» de la zona de modo que pueda adherirse a la pared uterina. La implantación del blastocisto humano comienza hacia finales de la primera semana y se completa hacia la mitad de la segunda semana. Aproximadamente 6 días después de la fecundación, el blastocisto se adhiere al epitelio del endometrio, generalmente a través del polo embrionario, el polo que contiene la masa celular interna.

Tan pronto como se adhiere al epitelio del endometrio, el trofoblasto comienza a proliferar rápidamente y se diferencia gradualmente en dos capas. A continuación, y también aproximadamente en el día 6, unas extensiones del trofoblasto se extienden a través del epitelio del endometrio e invaden el tejido materno. Hacia finales de la primera semana, el blastocisto está implantado superficialmente en la capa compacta de endometrio y obtiene su nutrición de los tejidos maternos erosionados: las células del estroma materno que se encuentran alrededor del sitio de la implantación se cargan de glucógeno y de lípidos.

⁶² Edwards, R.G., Beard, H.K. (1997) Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular Human Reproduction* 3, 863-905. Tesarik, J. y Kopecny, V. (1989a). Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Research* 24, 135-149. Tesarik, J., Kopecny, V. (1989b) Nucleic acid synthesis and development of human male pronucleus. *Journal of Reproduction and Fertility* 86, 549-558

El embrión comienza a producir una hormona (la gonadotropina coriónica humana, hCG) que pasa a la circulación materna. Esta hormona mantiene la actividad del ovario durante la gestación. El embrión de 10 días está totalmente embebido en el endometrio. El final de la segunda semana (días 13 y 14) se caracteriza por la aparición de las *vellosidades coriónicas primarias*, la primera etapa en el desarrollo de la placenta.

Simbiosis con la madre: ni parte de ella, ni injerto extraño

La relación, o dialogo molecular, madre-hijo tiene un carácter de simbiosis. Efectivamente, diversos datos acerca de la tolerancia fetomaternal demuestran que el embrión, al implantarse, no se comporta como un injerto, y tampoco es una parte del cuerpo materno. Se establece en cambio una perfecta tolerancia por parte de la madre hacia el embrión y por parte del feto hacia la madre.

Puesto que todos los seres humanos difieren entre sí y llevan «etiquetas» que los individualizan, los órganos transplantados de una persona a otra son rechazados, a no ser que se amordace el sistema de reconocimiento de lo propio, el sistema inmunitario. En el cigoto la mitad de los «marcadores de lo propio» provienen del padre, y la otra mitad de la madre. El huevo fecundado y la placenta son por tanto «mitad» extraños al organismo materno.

En ciertos casos de procreación médicamente asistida, el embrión procede de la fecundación de un ovocito y de un espermio proveniente de donantes: él es totalmente extraño a la madre que lo lleva y puede ser rechazado.

Hoy sabemos que, sin un tratamiento inmunosupresivo apropiado, los transplantes de órgano entre donantes y receptores incompatibles acaban en un rechazo intenso, mientras que en gestaciones sucesivas, las placentas son cada vez mejor toleradas y (cada vez de mayor tamaño); los embarazos sucesivos favorecen una tolerancia inmunitaria de la madre cada vez mayor hacia los tejidos paternos. Toda una red de sustancias inhibitorias actúa localmente para mantener la tolerancia inmunológica de la madre para el niño que gesta⁶³.

⁶³ Chaouat G (2001) Inmunología del embarazo Temas 25 Investigación y Ciencia, 36-41.

Presentación de los antígenos del padre

Una proteína presentadora (llamada HLA-G) situada en la superficie del tejido exterior del embrión, presenta al sistema inmunitario de la madre lo que en el embrión es del padre⁶⁴. De esta forma el embrión es tolerado por la madre, a pesar de que tiene antígenos que pertenecen a su padre, gracias a toda una red de sustancias que inhiben localmente el sistema inmunitario, y que se sintetizan tras la presentación.

En las primeras etapas de vida y gracias a los componentes del oviducto maduro, el embrión comienza a ayudar a la madre a tolerar lo que por pertenecer al padre lleva como diferente: un diálogo programado y muy elaborado, que «plantea cuestiones y respuestas moleculares», se instaura entre la madre y el embrión, que prologa otros diálogos que se establecen desde el principio entre la madre y su hijo. La aceptación para gestar el hijo pasa por este diálogo «tolerante» desde el momento de las primeras fases de la vida. La imposibilidad de tal diálogo en las diferentes fases de la FIV hacen del hijo un injerto extraño a la madre, y la respuesta defensiva de ésta causa el rechazo del hijo. De ahí la escasa eficacia de la implantación de embrión generado *in vitro* y transferido a la madre uterina, que no le ha engendrado.

⁶⁴ Le-Bouteiller P The functionality of HLA-G is emerging (1999) Immunol Rev., 167,233-44.