

# SIGNIFICACION DE LAS PRIMERAS ESTIRPES CELULARES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO. RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA GESTACION

## SIGNIFICANCE OF THE EARLIEST CELL STRAINS IN EMBRYO DEVELOPMENT. MATERNAL RECOGNITION

Pérez Gutiérrez, J.F.

Departamento de Patología Animal II. Facultad de Veterinaria. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. España.

### Palabras clave

Gestación. Fragmentación y valoración de mórulas.

### Additional keywords

Pregnancy. Fragmentation and Morula valoration.

### RESUMEN

El presente trabajo pretende poner de manifiesto nuevos conceptos respecto al reconocimiento maternal de la gestación, la significación de las estructuras morulares blastocitarias, zona pelúcida, etc., así como nuevos criterios respecto a la evaluación de embriones y la utilización de los segmentos resultantes de la división de los embriones antes de la implantación.

Asimismo presenta nuevas consideraciones sobre ovocito, ovocito fecundado, activación del genoma, papel de la zona pelúcida, significación del blastocisto y blastómeros blastogénéticos o embriogénéticos. También se formulan nuevos conceptos respecto a evaluación de los embriones y utilización de las partes resultantes de la división de los mismos.

### SUMMARY

Maternal recognition of pregnancy involves three distinct levels: The blastocyte (oviduct), the blastocyst (uterine environment) and the cytotrophoblast (uterine mucosa).

Early in the development of the morula, two different cell strains can be differentiated, trophogenic and embryogenic cells, which are responsible for the

structures involved in supplying nutrients and in embryo formation, respectively. These strains generate trophoblastins for embryonic development.

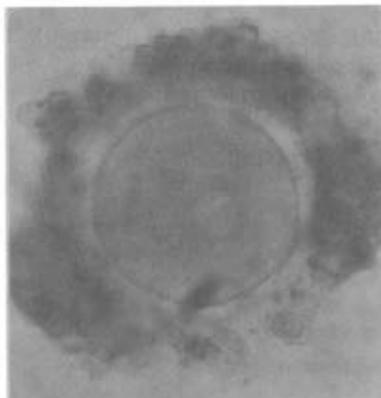
The zona pellucida is not solely responsible for the antigens involved in the immune response during pregnancy.

In the fragmentation of the morula (surgical division), only those fragments that contain embryogenic cells are viable (embryogenesis).

### INTRODUCCION

Las fases del desarrollo a partir del ovocito fecundado pasan por: cigoto (célula diploide), mórula (conjunto celular limitado por la pelúcida), blastocisto, embrión y fase fetal).

El ovocito es una célula privilegiada que procede de la línea germinal que se aloja posteriormente en el ovario rodeado de estructuras protectoras y al mismo tiempo nutrientes e inductoras, para integrar el llamado *complejo folicular*. Del complejo



**Figura 1.** Tetraploide a las 48 horas de la fertilización. (Tetraploid 48 hours after the fertilization).

folicular el ovocito recibirá no solamente los elementos necesarios para su integración (evolución primitiva): capa pelúcida, contenido citoplasmático, etc., sino la protección que representan las células del *cumulus ooforo* de gran interés para el porvenir biológico de esta célula. El ovocito es una célula relativamente pequeña en los mamíferos si la comparamos con el ovocito de los peces, anfibios, reptiles y especialmente de las aves (figuras 1 y 2.2).

A los 2-3 días de la fecundación el ovocito inicia su *actividad funcional* a partir del diploide. En este momento las células comienzan a sintetizar RNA. Hasta entonces los niveles eran semejantes a cualquier célula activa del organismo. Puede admitirse que la fertilización significa el *despertar de la síntesis del RNA*, de tal manera que los genes respectivos comienzan a funcionar codificando proteínas diferentes a las de la madre que son las responsables de lo que podríamos

llamar crecimiento específico del propio ovocito, pero a partir de la fecundación, las proteínas derivadas de la línea paterna se comportan como elementos extraños para el organismo de la madre.

## RECONOCIMIENTO MATERNAL DE LA GESTACION

El reconocimiento maternal de la gestación es un proceso que se inicia en el momento mismo de la activación del genoma (formación del cigoto). Se trata de un entendimiento de carácter bioquímico (a nivel molecular) que se establece entre la madre y el propio cigoto, antes de que aquélla perciba su situación de gestación y que las técnicas más sofisticadas puedan diagnosticar el referido proceso.

El reconocimiento maternal de la gestación comprende tres fases fundamentales: nivel blastomérico (ambiente oviductal); nivel blastocístico, ambiente uterino y nivel citotrofoblástico a nivel mucosa uterina, como punto de partida del engranaje fetomaternal y por tanto el establecimiento de la placenta.

El primer episodio que se refiere al reconocimiento maternal de la gestación cuando el cigoto se encuentra todavía en la ampolla tubárica, decidido por la interacción de tres efectores: ovario, cigoto y el propio ambiente oviductal. Tan pronto como ingresa en el organismo materno un elemento extraño (proteínas de origen paterno), se ponen en alerta los linfocitos de tipo T y B que cuentan con un número amplísimo de receptores de captación, en virtud de los

## DESARROLLO EMBRIONARIO Y RECONOCIMIENTO MATERNAL

cuales localizan a las partículas extrañas para inmediatamente proceder a la reacción. En los animales superiores existen como mínimo 10 clones de linfocitos especializados no solamente en la detección de partículas abstractas sino de otras mucho más concretas y específicas; de manera que este número de clones con una inmensidad de receptores, no inferior a  $10^7$ , no dejan escapar la presencia de partículas extrañas permitiendo de esta forma una reacción inmediata.

### CIGOTO

Los tempos de división en los uterinos se mantienen muy irregulares. En todo caso el ritmo inicial se altera pronto, de modo a que a partir de las 4-5 divisiones la sincronización se rompe. Ocurre que tras una mitosis tiene lugar un periodo de pausa en el que se sintetiza RNA (a esta pausa se le conoce como G-1); este fenómeno se acentúa en las divisiones posteriores al estadio de 16 blastómeros.

Uno de los aspectos biológicos más llamativos, es el alto nivel metabólico del ovocito fertilizado, que se valora *in vitro* por el consumo de oxígeno y desprendimiento de bióxido de carbono. Se incrementan considerablemente en el paso de mórula a blastocisto. En principio el óvulo (ovocito fecundado) utiliza como material energético el piruvato-oxacetato o el fosfopiruvato, lactato, y solamente a partir del estadio de ocho células es cuando puede utilizar la glucosa como fuente energética. En este sentido las células foliculares que rodean al ovocito

formando el *cúmulo oóforo* actúan como un sistema de premetabolismo, en el sentido de que tales células convierten a la glucosa en piruvato, de esta manera, el ovocito lo puede utilizar con anterioridad al estadio señalado.

### PELUCIDA

Un aspecto apasionante desde el punto de vista biológico es el papel de la membrana pelúcida (envolvente del ovocito). Se trata de una membrana acelular integrada sencillamente por glicoproteínas, dos o más capas de glicoproteínas separadas por un espacio intermedio en el que existen abundantes zonas de hidratación. La pelúcida, en principio, se forma dentro de la cavidad folicular consecuencia de la actividad de las células de la teca interna, posteriormente se va desarrollando después de la ovocitación, en el sentido de incrementar su actividad bioquímica y en especial respecto a la aparición de poros o canales, que se acentúan a medida que el ovocito envejece; circunstancia que tiene gran interés respecto al paso de ciertas proteínas del exterior e incluso virus que mediante la activación de sus propias proteínas pueden abrirse paso, en virtud de lo cual, se explicarían ciertos mecanismos de contaminación del embrión y la penetración en el mismo de vectores de determinadas enfermedades.

La capa lipoproteica de la pelúcida está integrada por una zona de carácter liposoluble con radicales que contactan unos con otros, y otra de naturaleza hidrosoluble en la que aquéllos ocupan los extremos de la

cadena, existiendo fuerzas intermoleculares que garantizan la integridad de la pelúcida. El estrato lipofílico ocuparía la parte exterior, mientras que en el interior se situaría la sustancia de naturaleza hidrófila. Las demás proteínas (llamadas de membrana) se sitúan en la parte externa de la pelúcida deslizándose sobre ella a manera de iceberg. El material glicoproteico de la pelúcida está integrado en los mamíferos superiores, en términos generales, por un 71 p. 100 de proteínas y un 19 p. 100 de carbohidratos; entre los azúcares se encuentra la fucosa, manosa, monosa N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, el ácido siálico y ésteres fosfatos y sulfatos.

Es importante tener en cuenta que en la superficie de la pelúcida existen tres glicoproteínas muy interesantes que son la ZP1, ZP2 y la ZP3, cuyos pesos moleculares son de 200.000, 120.000 y de 83.000 respectivamente. Se ha podido demostrar que la CP3 interfiere a ciertos espermatozoides, teniendo un papel muy importante en la selección polispérmica; mientras que la CP1 actuaría como conductor de los espermatozoides para dirigirlos hacia la penetración en la pelúcida.

El hecho de que la pelúcida presente una membrana permeable (biológicamente) nos abre una perspectiva preocupante en orden a que el concepto que se tenía: ley *del todo o nada* en el sentido de que la pelúcida solamente era permeable cuando muere el conjunto blastocitario, representa una preocupación en el sentido de que es posible el paso de determinados virus (que a través de sus enzimas pueden abrirse camino por la misma). La pelúcida se encuentra recubierta

(en casi todas las especies) de una sustancia viscosa que al parecer tiene importancia en el movimiento de la mórula hacia el útero. Se ha discutido la importancia de la pelúcida en el origen de antígenos de compatibilidad. David-Phillips (1991) considera a la pelúcida como una especie de esponja en el sentido de estar perforada por multitud de túneles o conductos, exteriormente visibles que terminan en forma de fondos de saco en la parte interior (fenómeno difícil de interpretar). Se tiene la sospecha que estos conductos puedan ser abiertos por determinados virus creando túneles de penetración de proteínas procedentes del exterior.

## ACTIVACION DEL GENOMA

Uno de los aspectos importantes a tener en cuenta es el momento en que tiene lugar la *activación del genoma* en el cigoto, integrado por material genético procedente del padre y de la madre. Parece ser que la síntesis del RNA tiene lugar en el estadio de 2-4 blastómeros, por tanto el RNA se activa inmediatamente después de la fecundación.

En todas las especies la reproducción se plantea a nivel blastomérico un doble propósito: generar individuos nuevos (embriogénesis-fetogénesis) y la formación de una estructura (sistema nutricional) captador, productor y almacenador de energía para el desarrollo de los procesos biológicos necesarios para el curso gestacional. (Pérez Pérez y Pérez Gutiérrez, 1988 y 1992.)

Apartir de la formación de la mórula

comienzan a funcionar tres entidades de muy diferente complejidad: organismo materno, sistema nutricional y el embrión. El primero significa el donante principal del material (energía para el desarrollo) y en otros casos de los elementos base para las funciones de síntesis, desintegración y recomposición de nutrientes para salvar la barrera placentaria. El segundo sistema asume en los mamíferos la principal función de inmunotolerancia del producto de la concepción (gestación). De otra parte, el sistema placentario es el puente que facilita el tránsito en ambas direcciones de nutrientes y estimulantes del desarrollo, actuando no siempre como un simple filtro (actitud poco frecuente), sino como elemento activo (acción movilizadora, transformadora y sobre todo reguladora de procesos) que conllevan en todo caso consumo de oxígeno. En el año 1853 Claude Bernard demostró que la placenta actúa como órgano de síntesis y almacenamiento de nitrógeno al igual que el hígado en el adulto, denominándola en consecuencia *foie transitoire* puesto que tal función la va cediendo al feto a medida que se desarrolla en el hígado la capacidad funcional.

La tercera entidad biológica es el feto, que irá relevando a la placenta de funciones de síntesis para llegar a la gestación avanzada en que al final el feto y la placenta asumen toda la dependencia maternal (parto).

Cada día se evidencia nuevas actividades en la placenta. Es evidente en el proceso evolutivo de la placenta que ha tenido que adaptarse al medio en que se desarrollan las especies, pasando de la más simple estructura

a la más complicada de: peces, reptiles y anfibios para llegar a los mamíferos eutherios en que la placenta es un órgano eficaz para el desarrollo complejo del animal vivíparo (que nace con un grado singular de autonomía y adaptación al medio ambiente).

## MORULA

La mórula es un continente limitado por la membrana pelúcida que se llena progresivamente de células (blastómeras). Hertig en 1978 admite la existencia, en una mórula de mujer de 12 células de una gigante, de forma cuboide situada en el centro del conjunto con gran perspectiva vital respecto a la corta duración de las células que la rodean. A esta célula se le atribuye la condición formadora - embriogénica - capacidad que transmitiría a sus descendientes resultantes de sucesivas mitosis (figura 2). A partir de esta interpretación, Avendano (1975) y otros señalan en la mórula dos tipos celulares diferentes morfológicamente y sobre todo en la tendencia a la orientación polar que se advierte en uno de los grupos, tal como señala Vogler en 1987. Las llamadas *células formadoras o embriogénicas* (figura 2.4) son más grandes, adquieren forma poligonal o cuboide, presentan menor ritmo mitótico y por el contrario larga perspectiva vital (potencia prospectiva de Tarkowski, 1982). Otra estirpe la integran las células trofoblásticas, cuyo objetivo es el de potenciar y nutrir a las células anteriores. Asumen la formación del trofoblasto o estructura especializada en captación de nutrientes (figura

**2.5).** Se trata de células pequeñas (de mayor actividad mitótica), de corta perspectiva vital y tendencia a situarse en la zona superficial del conjunto, limitando asimismo el *espacio para crecer* que separa este conjunto celular de la pelúcida (perfil externo de la mórula). En esta situación evolutiva se encuentran las mórulas hasta llegar al útero en un plazo comprendido entre 3 y 10 días, variable de acuerdo con las especies. (Amoroso, 1976). En la mórula existe un cierto grado de deshidratación (que para algunos investigadores comienza con la penetración del espermatozoide en el ovocito y que se acentúa en el momento de la expulsión del segundo corpúsculo polar). Antes de la rotura y eliminación de la pelúcida se forman en la mórula pequeñas lagunas (espacios líquidos intercelulares). El medio líquido juega un papel muy importante en el éxito de las funciones evolutivas del proceso embrionario.

La cavidad blastocitaria tiene lugar en los eutherios cuando se llega a 20-30 blastómeros en el desarrollo, el crecimiento es rápido, tanto en la oveja como en la cabra para alcanzar incluso 20 cm de diámetro antes de la implantación (2-3 semanas), mientras que a las 16 semanas en el caso de la cerda ha incrementado su tamaño en unas 300 veces para llegar a constituir una gran bolsa que llega a tener más de un metro de longitud antes de la implantación. En todo caso la aparición de la cavidad blastocitaria no está relacionada con el tamaño del embrión. Es curioso que en el estadio 3-4 células, si destruimos alguna de ellas e incluso dejamos sólo una entorno a la misma

se forma la cavidad blastocitaria. Este mismo fenómeno se ha observado cuando los blastómeros se dispersan en cuyo caso cada blastómero será rodeado en breve por una vesícula blastocística. Los estudios de base bioquímica mediante indicadores radiactivos han podido demostrar el paso de sustancias al líquido que integra el blastocito. En él se ha demostrado una gran riqueza en potasio y de bicarbonato antes de la implantación, e inmediatamente después de la misma se reduce el contenido de las referidas sustancias como consecuencia del paso de las mismas al fluido uterino. Mientras que la proteína y la glucosa se incrementan procedentes de los flujos uterinos, todo como consecuencia de un control no llevado a cabo por el genoma del propio embrión.

En las células el citoplasma presenta numerosas vacuolas con estructuras de aspecto rugoso que contienen pequeñas cantidades de líquido; sin embargo, las células del trofoblasto polar (junto al botón embrionario) están poco diferenciadas en relación con las anteriores y no cubren en su totalidad al embrioblasto, sino que lo rodean como un anillo irregular. (Handyside y Hunter, 1984). Puede admitirse (Hertig, 1968) que a este nivel de desarrollo existen ya tres tipos de células bien diferenciadas: células embrioblastícas, trofoblastícas murales y trofoblastícas polares.

Las células que integran el trofoblasto mural se caracterizan porque presentan uniones celulares complejas adquiriendo un alto grado de polarización en la membrana celular. Estas uniones fuertes (*tight junctions*) determinan la impermeabilidad y ca-

## DESARROLLO EMBRIONARIO Y RECONOCIMIENTO MATERNAL

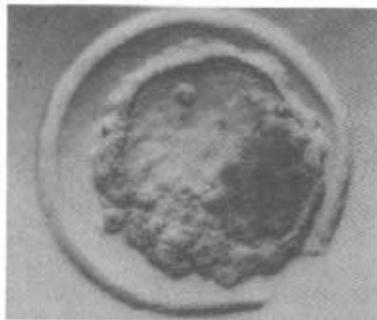
pacidad de membrana con relación al líquido que delimitan. Por el contrario en otros sectores las células están unidas por formaciones de tipo (*gap junctions*) dispuestas para el intercambio de nutrientes. Las células más superficiales completan su morfología con la presencia de microfilamentos citoplasmáticos especializados en captación de nutrientes. Este tipo de células de disposición focal constituye un círculo alrededor del polo apical donde se encuentra el botón embrionario formando uniones ocluyentes (*occludens*). La diferenciación estructural está relacionada con la especialización de las células trofoblásticas superficiales (con *microvilli*) para la captación de sustancias, mientras que en la parte dorsal presentan orgánulos citoplasmáticos y se disponen para una nutrición celular (hitotrófica) (Croxato *et al.* 1972).

El conjunto de células que rodean al botón embrionario (trofoblasto polar) que se unen y se proyectan hacia las células del botón mediante desmosomas, y prolongaciones citoplasmáticas que se introducen entre los espacios celulares formando interdigitaciones y uniones comunicantes, pero nunca uniones tensas. De acuerdo con Mohr y Rowson (1982), este dispositivo microvellosa constituye parte fundamental para el primer contacto (engranaje) con la mucosa uterina. Las células del trofoblasto dotadas ya de *microvilli* ponen de manifiesto su actividad al desaparecer la membrana pelúcida, la rotura empieza a producirse a la altura del trofoblasto polar precisamente donde los *microvilli* adquieren mayor desarrollo; circunstancia relacionada con

la capacidad de implantación que presenta esta región (Investigaciones de Hurst, 1978).

El embrioblasto está formado por células poligonales, cuboides y de mayor tamaño que las trofoblasteas, de otra parte se agrupan formando el conjunto llamado nudo embrionario. Estas células están unidas por desmosomas no muy diferenciados, dejando espacios intercelulares que se acentúan después de la desaparición de la pelúcida. Es frecuente ver uniones comunicantes de tipo *gap junctions* mientras que con las células del trofoblasto se establecen otro tipo de uniones más elementales (Mossman, 1970).

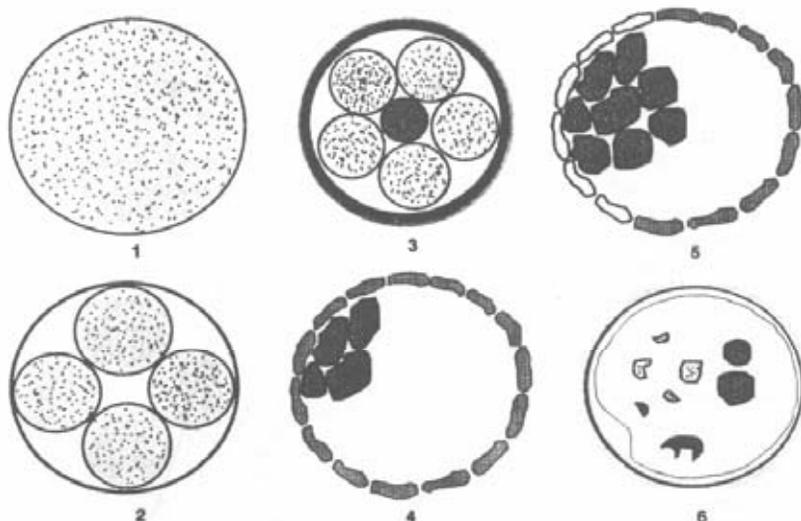
Según Copp (1978) la pérdida de la pelúcida en la especie humana tiene lugar al 6º día (**figura 3**).



**Figura 3.** Fase sucesiva al tetraploide. Se aprecia un blastómero central de diferente capacidad. La activación del genoma es evidente, con participación del RNA masculino. La pelúcida rota muestra tres estratos: lipófilo, hidratado e hidrófilo. (Next stage to the tetraploid. A central blastomere of a different capacity can be seen. The activation of the genome is evident, with the participation of the masculine RNA. The broken pellucida shows three layers: lipophile, hydrated and hydrophile).

Los trabajos de Kaufmann (1983) pusieron de manifiesto el carácter expansivo y penetrante de las células del trofoblasto exonerando la implantación intersticial tras un fenómeno de invasión continua por mecanismos de erosión, degeneración y

fagocitosis de la capa endometrial de la decidua. En las especies de implantación invasiva o deciduada las lagunas trofoblásticas se conectan unas con otras y a su vez con los vasos de la decidua estableciendo una circulación de tipo nutricional a



**Figura 2.** 1. Configuración esquemática de un ovocito. 2. Tetraploide a las 48 horas de la fertilización. 3. Fase sucesiva al tetraploide. Se aprecia un blastómero central de diferente capacidad. En esta fase la activación del genoma es evidente con participación del RNA masculino. La pelúcida muestra tres estratos: lipófilo, hidratado e hidrófilo. 4. Conjunto celular en dos claras estirpes: células blastogénicas y embriogénicas. 5. Diferenciación de tres tipos de células: blastogénicas murales y basales y embriogénicas (responsables del nuevo ser). En las células blastogénicas basales, se observa mayor desarrollo por el efecto inductor (tráfico) generado por las células embriogénicas (botón embrionario). 6. Blastocisto anormal (degenerado): blastómeros dispersos, rotos, etc. (1. Schematic configuration of an ovocyte. 2. Tetraploid 48 hours after the fertilization. 3. Next stage to the tetraploid. A central blastomere of a different capacity can be seen. In this stage the activation of the genome is evident, with the participation of the masculine RNA. The pellicula shows three layers: lipophile, hydrated and hydrophile. 4. Cellular group in the clear strains blastogenic cell and the embryogenic ones. 5. Different types of cells: wall blastogenic, basal blastogenic and embryogenic responsible of the now being. In the blastogenic basal cells a greater development can be seen due to the inductor effect caused by the embryogenic cells. 6. Anomal blastocysts (degenerated), dispersed blastomeres, broken ones, etc...

partir de la cual empieza la nutrición hemotrófica de la placenta.

### SIGNIFICACION DE LA CAVIDAD BLASTOCISTICA

La cavidad blastocística no es sólo una realidad (discutida hace unos años en la especie humana) sino que en contra de las afirmaciones de Hertig (1968), se evidencia claramente en las mórulas cultivadas. A este respecto hay que señalar que los avances de la fecundación *in vitro* y el trasplante de embriones han permitido un conocimiento puntual de las mórulas que representan el punto de partida de la referida tecnología. La fecundación *in vitro* ha sido fundamental para el mejor conocimiento de las mórulas, al ser éstas generadas en el laboratorio (Johnson *et al.*, 1981).

Las investigaciones mediante microscopía electrónica (Lopata *et al.*, 1982 y Mohr y Rowson, 1982) demuestran que las células trofoblásticas contienen abundantes vesículas con gránulos que vierten a la cavidad blastocitaria, naciendo así un concepto interesante de suministro de materia nutritiva para las células nobles que integran el conjunto embriogénico.

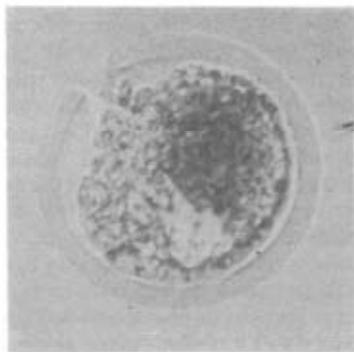
La compactación (mórula compacta) es un fenómeno anterior y de otra parte imprescindible para la formación y el mantenimiento de la cavidad blastocística. Las células que limitan la misma han de estar fuertemente unidas para evitar la pérdida de líquidos mediante *tight junctions*, responsables del llamado *sellado* de la mórula que permite el acúmulo de líquido

(sin pérdidas) generado por las vesículas contenidas en las células del trofoblasto.

El paso de la mórula al útero, representa un fuerte estímulo de crecimiento que obliga a la rotura de la pelúcida. Se observa durante esta fase una enorme apatencia por agua (deshidratación morular) para formar de esta manera el gran conjunto o laguna que constituye el blastocisto expandido. Nuestra opinión es que este fenómeno está relacionado con la muerte embrionaria frecuente en hembras pluritocales, resultando por tanto un factor importante en la reducción de los integrantes de la camada. El paso del agua del exterior al conjunto blastocitario tiene lugar por tres mecanismos. La singular permeabilidad de las estructuras como consecuencia del efecto permeabilizante de la progesterona, que se acentúa notablemente a nivel del cemento que une las células del trofoblasto; como consecuencia de cambios en la presión oncótica y fundamentalmente por la puesta en marcha de bombas de transporte de líquido hasta el interior. Parece ser que estos mecanismos pueden ser coincidentes ya que ha sido comprobada la existencia del sodio Na/K ATPasa en las células del trofoblasto. En este caso la Na/K-ATPasa no sólo participaría en el transporte de vesículas y de mitocondrias a la región superficial antes de la formación de la cavidad, sino en la producción de líquido y en la formación de esa cavidad.

Se admite, que las células del botón embrionario cuentan con estímulos tróficos (de desarrollo) que transmiten en principio a las células más

próximas (trofoblásticas) que adquieren por ello mayor desarrollo (**figura 4**). Del vigor, diferenciación notable de estas células depende el éxito implantatorio, de ahí que este detalle deba ser tenido muy en cuenta en el control de calidad de los embriones (Kaufmann, 1983). En todo caso, el trasplante de embriones en base a blastómeros debe partir de células procedentes del botón embrionario ya que el trasplante en base a células blastoméricas sería infructuoso. El grado de compactación (anterior al blastocisto) no adquiere en este sentido valor de calidad.



**Figura 4.** Diferenciación de tres tipos de células: blastogénicas murales, blastogénicas basales y embriogénicas (responsables del nuevo ser). En las células blastogénicas basales, se observa mayor desarrollo por el efecto inductor (trófico) generado por las células embriogénicas (botón embrionario). (Different types of cells: wall blastogenic basal blastogenic and embryogenic (responsible of the new being). In the blastogenic basal cells a greater development cause seen due to the inductor effect caused by the embryogenic cells.)

## COMPACTACION DE LA MORULA

Uno de los temas más apasionantes es llegar al conocimiento de cómo (dentro del ambiente morular) se diferencian las células resultantes de la primera célula diploide en embriogénicas y blastogénicas, es decir formadoras de embriones y del trofoblasto respectivamente. Se han formulado tres teorías: teoría de la segregación, enunciada por Seidel (1970); teoría de la diferenciación interna-externa de Herbert y Graham (1987) y la teoría de la polarización de Johnson (1989).

## NUEVOS CRITERIOS PARA LA EVALUACION DE EMBRIONES Y DIVISION DE LOS MISMOS

Respecto a la valoración de embriones y la partición de los mismos antes de llevar a cabo la técnica de trasplante en el útero de las hembras adecuadamente preparadas - receptoras las mórulas pueden ser agrupadas según las siguientes denominaciones:

### EXCELENTE

- Perfecta compactación de las células, sin expresarse campos dispersos de blastómeros aislados.
- Regularidad en la forma después de haber valorado los correspondientes diámetros del embrión.
- Variación en el tamaño de las células (blastómeros) que ha de ser homogéneo y regular.
- Citoplasma homogéneo en orden al color, homogeneidad (aspecto uni-

forme así como referente a textura). El citoplasma no debe ser ni muy claro ni muy oscuro y de asepto finamente granular, de manera que de la impresión de que el contenido está bien distribuido.

#### CALIDAD BUENA

Se trata de embriones de calidad inferior, cuyos parámetros han de ser los siguientes:

-Zona oval con blastómeros bien distribuidos, con algunos más pequeños; ligera simetría. Los blastómeros no compactos se encuentran en áreas no muy grandes, pudiendose apreciar algunas zonas de degeneración.

#### EMBRIONES NORMALES.

El embrión de calidad normal, más pobre que el anterior se refiere a blastómeros degenerados con zonas en que el tamaño de los mismos es muy variable. Hasta hace algún tiempo este tipo de embriones se consideraba como muy poco recomendables.

#### EMBRIONES DE CALIDAD BAJA.

Presentan todo tipo de alteraciones celulares y por tanto blastoméricas: blastómeros aislados, pequeños, irregulares, zona pelúcida alterada y singularmente síntomas de contaminación. Este tipo de embriones resulta completamente desechable puesto que no solamente no ofrecen ninguna garantía de posibilidades de fertilización y por el contrario pueden presentar graves peligros respecto a infecciones (**figura 5**).

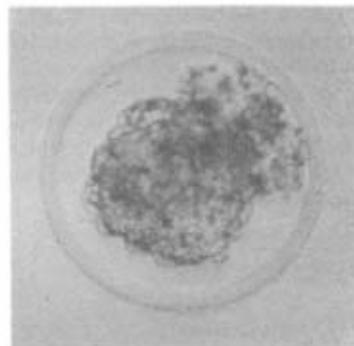
-Respecto a la zona pelúcida hay que tener en cuenta que no se en-

cuentre colapsada, arrugada, fracturada, fisurada, etc.

La pelúcida (en contra de la opinión clásica) no resulta necesaria para el desplazamiento de los embriones hasta la cavidad uterina. Parece ser que el papel fundamental es la elaboración de antígenos de inmunocompatibilidad. De ahí que introduciendo dentro de la misma, blastómeros heterólogos, se evita el rechazo haciendo posible el éxito del trasplante.

La pelúcida debe romperse para permitir la expansión del blastocisto de manera que los fallos en este proceso, pelúcida endurecida (indehisciente) sería responsable del fracaso.

Otro papel fundamental es la presencia de los factores: ZP1, ZP2 y ZP3 que actúan no solamente permeabilizando los canales de paso existentes en la misma, sino por lo que respecta al PC3 canalizando (previa selección al espermatozoide que ha de penetrar).



**Figura 5.** Blastocisto anormal (degenerado), blastómeros dispersos, rotos, etc. (Anormal blastocyst (degenerated), dispersed blastomeres, broken ones...)

El significado de blastómeros muertos (zonas degeneradas), que se ha interpretado como motivo de exclusión de los mismos en el transplante de embriones. En la actualidad no tiene justificación absoluta al demostrarse que generan estímulos de desarrollo y división del resto de los blastómeros, al elaborar un factor que parece identificarse con el de la *necrosis tumoral* de singular actividad trófica.

La división de mórulas y blastocistos utilizando demiembriones en el transplante que evidentemente incrementa los resultados de la técnica del T.E., tiene el riesgo (fallos), cuando una de las mitades no lleva algún blastómero embriogénico y sólo blastogénicos. Este riesgo es menor cuando la partición de los embriones (corte de los mismos) se hace precozmente.

No es cierto que en principio -hasta el 6º día- (en los mamíferos en general) todos los blastómeros son totipotentes (capaces de generar cada uno un individuo). Esta facultad sólo la tienen los blastómeros embriogénicos que se diferencian muy precozmente y no los blastómeros blastogénicos cuya función es la génesis del sistema placentario.

## CONCLUSIONES

-El reconocimiento maternal de la gestación es un episodio de singular importancia, puesto que representa la posibilidad de supervivencia del cigoto al ser protegido de la acción inmunodestructora de las células Nk

agresivas de la madre. El reconocimiento maternal de la gestación se resuelve en tres instancias:

-A nivel cigoto (mórula) en el ambiente oviductal, el factor de protección inmunológica (Inmunocompatibilidades) es en base al factor EPG (*Early Pregnancy Factor*) que es generado por una interacción entre efectos ováricos, del cigoto y del propio ambiente tubárico.

-En segunda instancia el reconocimiento maternal de la gestación a nivel blastocisto (ambiente uterino), se resuelve por efecto de las trofoblastinas (TP) generadas por los propios trofoblastos.

-En tercera instancia la inmunocompatibilidad a nivel citotrofoblasto y en el ambiente de la mucosa uterina tendría lugar mediante la existencia de células específicas orientadas a generar antígenos inmuno-depresores y por tanto de compatibilidad, cuyo efecto se suman las leucinas, linfocinas y especialmente las encefalinas que generan factores de crecimiento para las células binucleadas y del trofoblasto, así como factores que inhiben la formación de prostaglandina F2 $\alpha$  que anulan receptores para la oxitocina a nivel uterino y estimulan la progestopoyesis; se descubren interferones de gran actividad procedentes de retrovirus y sustancias oncogénicas que actúan como energéticos factores de desarrollo al mismo tiempo que producen la activación plaquetaria.

-La membrana pelúcida resulta interesante no solamente como elemento de aislamiento del conjunto blastocitario, sino como *factor de selec-*

## DESARROLLO EMBRIONARIO Y RECONOCIMIENTO MATERNAL

*ción espermática*; si bien las modernas investigaciones demuestran que su permeabilidad es posible especialmente en base a la activación de determinadas proteínas contenidas en algunos virus. De ahí el peligro de que a través de las mismas se puedan transmitir enfermedades, incluso cumpliendo las normas internacionales referentes al lavado con antibióticos de la parte externa de la misma antes del trasplante de embriones.

-La pelúcida no es necesaria para el traslado del conjunto embrionario a través de las trompas uterinas y por supuesto debe romperse a los pocos días de la situación del blastocisto en la cavidad uterina, a fin de permitir el desarrollo del mismo (blastocisto expandido).

-La pelúcida contiene elementos antirrechazo (antígenos de inmunocompatibilidad) que hacen posible la gestación e incluso permiten el éxito implantatorio de mórulas con contenido blastocitario procedente de especies distintas, transportadas en pelúcidas homólogas.

-La fertilización puede definirse como el momento en el que empieza a activarse el genoma del embrión, que a partir de los 2-4 blastómeros gobernará los procesos de desarrollo del mismo.

-Antes de la fertilización el genoma de la madre es capaz de decidir los procesos de desarrollo del propio ovocito, pero a partir de la misma, es el genoma del embrión quien actúa en este sentido.

-La presencia de los factores ZP1, ZP2 y ZP3 explican el mecanismo de

la pelúcida en orden a la penetración de espermatozoides y respecto a la selección poliespérmica para conseguir la impregnación (penetración).

-La pelúcida tiene una estructura esponjosa dentro su composición glicoproteica con canales aparentemente cerrados que se abren a medida que el ovocito envejece como si de este modo quisiera dar oportunidad a la penetración del espermatozoide. En todo caso existen mecanismos, no bien conocidos, que incrementan la dilatación de los referidos canales en virtud de la cual se favorecía el proceso de penetración espermática y por tanto el éxito respecto a la fertilización.

-Se evidencia que dentro del conjunto de la mórula y del blastocisto existen células (blastómeros) degeneradas, muertas, etc, en las que se elaboran factores estimulantes para el desarrollo de las demás, de ahí que los embriones que aparentemente pudieran parecer desechables por presentar las referidas zonas de degeneración resultan, sin embargo, interesantes y a veces muy interesantes para el éxito fecundante.

-La partición del blastocisto (trasplante de demiembriones) para incrementar el rendimiento de la técnica conlleva el riesgo de que una de las mitades esté simplemente integrado por células blastogénicas en este caso el fracaso del trasplante es evidente, de ahí que para el éxito sea necesario que en los elementos resultantes de la partición del embrión existan por los menos alguna célula embrioblástica, es decir procedente del botón embrionario.

## BIBLIOGRAFIA

- Amoroso, E.C. 1976.** Comparative aspects of the hormonal functions of the placenta. En Villee CA (ed) The placenta and fetal membranes. William and Wilkins, Baltimore.
- Avendano, 1975.** A seven-cell human egg recovered from the oviduct. *Fert. Steril.* 26:1167-1172
- Copp, A.J. 1978.** Interaction between inner cell mass and trophoectoderm of the mouse blastocyst. I. A study of cellular proliferation. *J. Embryol. Exp. Morph.* 48: 109-123.
- Croxato HB, S. Diaz, B. Fuentealba, H.D. Croxato D. Carrillo and C. Fabres 1972.** Studies on the duration of egg transport in the human oviduct. *J. Fert Steril* 23: 447-458.
- David-Phillips. 1991.** The estructure of pelucida. *Anat. Rec.* 260-280.
- Handyside, A. and S. Hunter 1984.** Cell division in the inner cell mass of the mouse blastocyst is restricted before implantation. *J. Embryol Exp. Morph.* 82 suppl.: 64-65.
- Herbert, M.C. and C.S. Graham. 1987.** Cell determinations and biochemical differentiation of the early mammalian embryo. *Curr. Top Develop. Biol.* 8:151-174.
- Hertig, A.T. 1968.** Human trophoblast. Thomas, Springfield.
- Hurst, P. R. 1978.** Structural study of the implantation uterine embryo. *J. Anat.* 126: 209-220.
- Johnson, M.H., H.P.M. Pratt and A.H. Handyside. 1981.** The generation and recognition of position information in the preimplantation mouse embryo. En: Glasser R. Bullock T. Cellular and molecular aspects of implantation. Plenum Press. New York. 55-74.
- Johnson, M.H. 1989.** Membrane events associated with the generation of a blastocist. *Int Rev Cytol.* 12: 1-37.
- Kautmann, P. 1983.** Vergleichend-antomische und funktionelle Aspekte des Placenta-Baus. *Funkt Biol Med.*
- Lopata, A., D.J. Kohlmann and G.N. Kellow. 1982.** The fine structure of human blastocysts developed in culture. En: Burger A (ed.) Embryonic development, part B. Alan R. Liss. New York. 69-85.
- Mohr L.R and A.O. Rowson. 1982.** Comparative study of hatched human, mouse and bovine blastocysts. *J. Reprod Fertill;* 66: 499-504.
- Mossman, H.V. 1970.** Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contr. Embriol.* 26: 137-147
- Pérez Pérez F. y J.F. Pérez Gutiérrez. 1988.** Glándula mamaria. Ed. Universtaria. Madrid 1988.
- Pérez Pérez F. y J.F. Pérez Gutiérrez. 1992.** La Placenta, estudio comparativo. Ed. Diaz de Santos, Madrid.
- Seidel, F. 1970.** Entwicklungspotenzen des frühen Säugerkeimes. Westdeutscher. Köln: 1-91
- Tarkowski, A.K. 1982.** Embrionic an d post natal development of mouse. CIBA Found. Symp. Churchill, London, 183-193.
- Vogler, H. 1987.** Human Blastogenesis. Karger. Basel.

Recibido: 26-3-94. Aceptado: 15-9-94