

*Este informe recoge la opinión colectiva de un grupo internacional de especialistas y no representa necesariamente el criterio ni la política de la Organización Mundial de la Salud.*

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD  
SERIE DE INFORMES TECNICOS  
Nº 333

# QUIMICA Y FISILOGIA DE LOS GAMETOS

**Informe de un Grupo Científico de la OMS**

	Página
1. Introducción . . . . .	3
2. Origen de las células germinales . . . . .	4
3. La espermatogénesis y el espermatozoide . . . . .	5
4. La ovogénesis y el óvulo . . . . .	12
5. La fecundación y las primeras fases del desarrollo embrionario . . . . .	16
6. Investigaciones necesarias . . . . .	23

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD  
GINEBRA

1966

## GRUPO CIENTIFICO SOBRE QUIMICA Y FISILOGIA DE LOS GAMETOS

Ginebra, 2-8 de noviembre de 1965

### Miembros :

- Dr. A. W. H. Braden, Ian Clunies Ross Animal Research Laboratory, Division of Animal Physiology, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Parramatta, Nueva Gales del Sur, Australia
- Dr. R. J. Flipse, Department of Dairy Science, The Pennsylvania State University, Penn., Estados Unidos de América
- Profesor K. S. Ludwig, Instituto de Anatomía, Universidad de Basilea, Suiza
- Dr. J. Molnar, Departamento de Urología, Facultad de Medicina de Budapest, Hungría
- Profesor A. Monroy, Instituto de Anatomía Comparada, Universidad de Palermo, Italia (*Relator*)
- Dr. E. F. Oakberg, Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn., Estados Unidos de América
- Dr. R. Ortavant, Laboratoire de Physiologie de la Reproduction, Institut national de la Recherche agronomique, Jouy-en-Josas, Seine-et-Oise, Francia (*Vice-presidente*)
- Profesor J. J. Pasteels, Chef du Service d'Anatomie et d'Embryologie humaines, Université libre de Bruxelles, Bruselas, Bélgica (*Presidente*)
- Dr. C. Polge, Animal Research Station, Unit of Reproductive Physiology and Biochemistry, Agricultural Research Council, Cambridge, Inglaterra (*Relator*)

### Secretaría :

- Dr. M. W. H. Bishop, University of Bristol School of Veterinary Science, Langford House, Langford, Bristol, Inglaterra (*Asesor temporero*)
- Dr. R. T. Hill, Jefe del Servicio de Reproducción Humana, OMS, Ginebra (*Secretario*)

---

© Organización Mundial de la Salud 1966

Las publicaciones de la Organización Mundial de la Salud están acogidas a la protección prevista por las disposiciones sobre reproducción de originales del Protocolo 2 de la Convención Universal sobre Derecho de Autor. Ello no obstante, los organismos gubernamentales, las sociedades culturales y científicas y las asociaciones profesionales pueden reproducir ilustraciones, datos o extractos de esas publicaciones sin necesidad de pedir autorización a la Organización Mundial de la Salud.

Las entidades interesadas en reproducir o traducir íntegramente alguna publicación de la OMS deberán solicitar la oportuna autorización de la División de Servicios de Edición y de Documentación, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. La Organización Mundial de la Salud dará a esas solicitudes consideración muy favorable.

PRINTED IN FRANCE

# QUIMICA Y FISILOGIA DE LOS GAMETOS

## Informe de un Grupo Científico de la OMS

### 1. INTRODUCCION

1.1 El Grupo Científico de la OMS sobre Química y Fisiología de los Gametos se reunió en Ginebra del 2 al 8 de noviembre de 1965 con objeto de asesorar al Director General sobre el estado actual de los conocimientos y de las investigaciones en curso sobre esta materia. Este Grupo ha sido el octavo de una serie de grupos científicos especialmente convocados para estudiar en detalle la biología de la reproducción. El Dr. L. Kapiro, Director de la División de Servicios de Salud Pública, abrió la reunión y dio la bienvenida a los participantes en nombre del Director General de la OMS. El Grupo eligió Presidente al Profesor J. J. Pasteels, Vicepresidente al Dr. R. Ortavant y Relatores al Profesor A. Monroy y al Dr. C. Polge.

1.2 Ya a finales del siglo XIX se conocían bastante bien la biología de las células germinales del animal y sus funciones en la fecundación y primeras fases del desarrollo embrionario. Desde entonces los progresos han sido incesantes y en el curso de los dos últimos decenios se han intensificado considerablemente gracias al estímulo de algunos problemas prácticos acuciantes como, por ejemplo, la necesidad de aumentar la producción ganadera o el tratamiento de la esterilidad y la regulación de la fecundidad en los seres humanos. Por otra parte, hoy ha pasado a primer plano el interés por la biología de las radiaciones y por los mecanismos genéticos fundamentales.

1.3 El Grupo examinó diversas cuestiones relacionadas con el origen de las células germinales en el embrión, su maduración hasta la fase de gametos definitivos en el adulto y las interacciones de los propios gametos en la fecundación y primeras fases del desarrollo embrionario, especialmente en los mamíferos; de esa manera se pudo advertir que, en general, la información existente respecto a los primates es bastante escasa. De todas formas, no dejan de ser notables las semejanzas básicas existentes entre los distintos órdenes de mamíferos y naturalmente entre los diferentes *phyla* del reino animal, semejanzas que una vez más ponen de manifiesto el valor de los estudios comparativos efectuados en gran variedad de especies; a este respecto destaca sobre todo la importancia de los estudios efectuados sobre la fisiología de los invertebrados marinos.

1.4 El presente informe resume el estado actual de los conocimientos sobre la biología de las células germinales, especialmente de los mamíferos, y concluye con una enumeración de los problemas que el Grupo considera más interesantes desde el punto de vista de la investigación.

## 2. ORIGEN DE LAS CELULAS GERMINALES

### Células germinales primordiales

2.1 Hoy está virtualmente demostrado que los gametos de ambos sexos proceden de las células germinales primordiales que se diferencian en las primeras fases del desarrollo embrionario. En varias especies de mamíferos estas células aparecen al principio en la región del surco primitivo y en la raíz de la alantoides y después emigran a través del mesenterio dorsal, hasta los repliegues gonadales que más tarde darán lugar a las gónadas.

2.2 En un principio es imposible distinguir las células primordiales de uno y otro sexo, pese a ser genéticamente distintas, pero más tarde los repliegues gonadales y las células germinales contenidas en ellos se desarrollan de manera totalmente diferente en ambos sexos. En el macho, la principal función en la diferenciación de los testículos la ejerce la médula del repliegue gonadal y las células primordiales emigran hacia esa región. En el embrión, por el contrario, es el córtex del repliegue genital el factor más importante de la diferenciación del ovario, y en él quedan las células germinales.

2.3 Las células germinales primordiales se dividen por mitosis y terminan por dar lugar a las células germinales características de cada sexo. Esta diferenciación sexual parece depender de una acción exterior del soma, que a su vez está genéticamente determinada. En el macho existen todavía células primordiales en los testículos en el momento de nacer: el tipo más primitivo de célula germinal del adulto, la espermatogonia, puede existir antes del nacimiento en algunas especies, pero en otras no se forma hasta poco después. Las espermatogonias se transforman en espermatozoides en virtud de un complicado proceso de división y de diferenciación celulares. Al mismo tiempo forman nuevas espermatogonias, con lo cual evitan que se reduzca la reserva de células germinales. En la hembra las células germinales primordiales alcanzan antes su desarrollo y dan lugar a los ovocitos primarios antes del nacimiento o poco tiempo después. Los ovocitos primarios persisten después en el ovario durante toda la vida en fase de diplotene o ulterior. En la hembra no existe ninguna otra clase de célula germinal ni ningún mecanismo que permita renovar las reservas de ovocitos. La maduración completa del ovocito, seguida de la ovulación, no tiene lugar hasta la pubertad.

2.4 Las gónadas tienen un triple origen: 1) las células germinales primordiales dan lugar a espermatogonias en el macho y a ovogonias en la hembra; 2) el epitelio del repliegue gonadal se transforma en células de Sertoli en los testículos y en células foliculares en los ovarios, y 3) las células intersticiales de las gónadas, así como el estroma y los vasos sanguíneos, proceden del mesénquima. Las células germinales de los testículos y las células de Sertoli, que les sirven de apoyo, se organizan en un epitelio seminífero o espermático definitivo. En la hembra no existe un epitelio análogo; el término «epitelio germinal» aplicado al que recubre el ovario está injustificado, pues expresa un concepto erróneo sobre la función de ese tejido.

2.5 Los agentes patógenos y los factores genéticos que actúan sobre las células germinales primordiales durante la vida fetal son capaces de destruir o de reducir la fertilidad del adulto.

### 3. LA ESPERMATOGENESIS Y EL ESPERMATOZOIDE

#### El epitelio espermático de los mamíferos

3.1 El epitelio espermático definitivo de los mamíferos empieza a desarrollarse bastante antes de la pubertad. En ese momento aparecen los espermatozoides, pero la actividad espermatogénica aumenta hasta la edad adulta. No se sabe bien qué factores determinan el desarrollo y el mantenimiento del epitelio espermático en el adulto, aunque es evidente que actúan sobre todo a través de la adenohipófisis y del hipotálamo.

3.2 Las espermatogonias más primitivas están sometidas a un proceso de renovación constante que les permite producir, sin que disminuya su número, las espermatogonias destinadas a iniciar las divisiones celulares, así como las transformaciones morfológicas e irreversibles que culminarán en la producción del espermatozoide. Las espermatogonias primitivas aseguran así la renovación continua del epitelio seminal, pero se ignora por qué razón originan, según los casos, una nueva célula de su misma naturaleza o una espermatogonia que acabará produciendo un espermatozoide. La evolución de este último tipo de espermatogonias termina en el espermatocito primario que, dividiéndose por meiosis, da lugar a las espermátides que se diferenciarán en espermatozoides sin nuevas divisiones.

3.3 Valiéndose de la irradiación aguda por rayos X o mediante precursores radiactivos del ácido desoxirribonucleico (ADN) se ha podido medir en cierto número de especies el tiempo que transcurre entre la primera división de la espermatogonia primitiva y el momento en el que los espermatozoides quedan libres en el testículo, es decir, la «duración de la esper-

matogénesis». Este intervalo es de 35 días en el ratón, de 48 días en la rata, de 40 días en el carnero, de 54 días en el toro y de 72 días en el hombre. Así pues, la duración de la espermatogénesis varía según las especies, pero es en cambio notablemente constante dentro de una misma especie y nunca se ha podido modificar experimentalmente, por ejemplo, mediante la administración de gonadotrofinas. En consecuencia, todos los espermatozoides que salen de los testículos en un momento determinado tienen la misma edad, médase ésta a partir de la formación de las espermatogonias primitivas o a partir de cualquier otro momento del periodo de espermatogénesis. En todo instante y en cualquier punto del epitelio seminal, las distintas categorías de células germinales se encuentran agrupadas según un orden bien definido. En la mayor parte de los mamíferos estas asociaciones de distintos tipos celulares se suceden a lo largo del túbulo en forma de ondas, disposición que no se encuentra en el hombre. Normalmente en cada asociación celular coexisten elementos germinales de cuatro o cinco generaciones distintas, y las divisiones celulares y las modificaciones morfológicas dentro de estas generaciones o entre ellas están estrechamente coordinadas. La sucesión en el tiempo de las distintas generaciones está determinada inicialmente por la división de las espermatogonias primitivas, pero no se sabe cómo tiene lugar y en qué forma se mantiene la coordinación entre las distintas células.

3.4 La profase de la primera división meiótica del espermatocito primario ocupa una gran parte — aproximadamente los tres octavos — de la duración de la espermatogénesis. Durante este tiempo se producen en el núcleo transformaciones muy semejantes a las observadas en el ovocito primario (párrafos 4.3 y 4.4), incluso con formación de cromosomas en « escobilla limpialámparas » que sintetizan ácido robonucleico (ARN), pero el significado de estas transformaciones dista de estar claro. La segunda división meiótica, la de los espermatocitos secundarios para formar las espermátides, es muy rápida. Los estudios microespectrofotométricos han demostrado que los espermatocitos primarios en profase contienen una cantidad tetraploide de ADN, los espermatocitos secundarios una cantidad diploide y las espermátides una cantidad haploide. Otra consecuencia importante de la meiosis es que los espermatocitos secundarios y las espermátides tienen genotipos distintos.

3.5 Las modificaciones morfogenéticas de la espermátide que culminan en la formación del espermatozoide ocupan asimismo tres octavas partes aproximadamente de la duración de la espermatogénesis. Esas transformaciones, englobadas en el término común de espermiogénesis, implican una profunda redistribución de los elementos nucleares y citoplásmicos de la espermátide. En primer lugar, el núcleo adopta un aspecto de interfase con nucléolo visible y cabe suponer que ejerce una activi-

dad metabólica, aunque exista una segregación haploide de los genes. Más tarde se condensa y deja de presentar cromosomas individualizados, la proteína nuclear se transforma en una histona muy rica en argonina y el núcleo se hace extraordinariamente resistente a la dosoxirribonucleasa. En resumen, el espermatozoide presenta un núcleo en interfase, condensado y resistente, y pueden considerarse infundadas las pretendidas observaciones de cromosomas individuales condensados en su estructura.

3.6 Uno de los polos del núcleo de la espermátide se recubre de un capuchón característico, el acrosoma, que se forma a partir del aparato de Golgi. Este acrosoma contiene una sustancia lábil que se tiñe por la técnica del PAS (periodic acid-Schiff) y que parece contener hialuronidasa y una enzima (la llamada «zona-lisina») que permite a los espermatozoides penetrar en el óvulo. Si bien es fácil extraer la hialuronidasa de los espermatozoides de los mamíferos, casi siempre han fracasado los intentos de extracción de las «zonas-lisinas». No obstante, en los acrosomas del carnero, del toro y del conejo, se ha aislado recientemente una lipoglucoproteína que disuelve la zona pelúcida y dispersa las células de la corona del óvulo de la coneja. En algunas especies, la membrana nuclear que se encuentra bajo el acrosoma está modificada, formando un organelo que ha sido denominado «perforatorium» y cuya función se desconoce.

3.7 De los centriolos de la espermátide nacen los filamentos de la cola del espermatozoide, que se fijan a la membrana nuclear en el polo opuesto al del acrosoma. Se cree que están compuestos de una sustancia análoga a la actomiosina. Las mitocondrias de la espermátide se sitúan alrededor de la parte de los filamentos caudales más próxima al núcleo, formando el «segmento intermedio» de la cola, e intervienen en el metabolismo respiratorio del espermatozoide.

3.8 Durante la espermiogénesis, las espermátides se incrustan profundamente en las anfractuosidades de las células de Sertoli. La mayor parte del citoplasma de la espermátide y el ARN que contiene desaparece hacia el final de la espermiogénesis y es absorbida por las células de Sertoli. El espermatozoide está pues desprovisto de ARN y por ello es particularmente sensible al envejecimiento. Se ignora por qué mecanismo las espermátides salen de las células de Sertoli. En el cuello del espermatozoide persiste una pequeña gota del citoplasma residual del espermatozoide, «la gotícula citoplasmática», que contiene grasas y residuos del aparato de Golgi y parece desempeñar ciertas funciones durante la vida del espermatozoide en el interior del epidídimo. Por lo general, esa gotícula se desprende del espermatozoide antes de la eyaculación o durante ésta.

3.9 Es evidente que las células de Sertoli intervienen mucho en el mantenimiento de las células germinales y sufren modificaciones relaciona-

das con los fenómenos de la espermatogénesis. Normalmente no se dividen en el adulto y, por lo tanto, pueden acusar considerablemente el envejecimiento. En el perro, los tumores de estas células segregan grandes cantidades de estrógenos; incluso en ciertos animales, sobre todo en el caballo, el testículo normal segrega abundantes estrógenos si bien se desconoce la función exacta de esta secreción.

3.10 Las espermatogonias primitivas acusan tanto su propia senescencia como la del organismo en general (por ejemplo, la del lóbulo anterior de la hipófisis, etc.). En el toro, es evidente que la fertilidad del semen utilizado para la inseminación artificial disminuye lentamente a medida que aumenta la edad del donante, aunque no se observe ninguna modificación aparente de sus características.

3.11 La pérdida de gran número de células de todos los tipos parece ser una característica normal del epitelio seminal. Se ha pensado que esta destrucción puede ser un proceso selectivo destinado a eliminar las aberraciones genéticas graves que van apareciendo durante la división y diferenciación celulares. En ciertos híbridos interespecíficos, como el mulo, el acoplamiento de los cromosomas paternos y maternos homólogos se ve dificultado durante la profase de la primera meiosis, produciéndose así una detención total de la espermatogénesis y, por consiguiente, esterilidad.

3.12 Los trastornos espontáneos o provocados de la espermatogénesis dan frecuentemente lugar a la producción de espermatozoides anormales. Se considera generalmente, y en algunos casos basándose en datos demostrativos, que los espermatozoides morfológicamente anormales son incapaces de fecundar el óvulo; es posible, no obstante, que ciertas anomalías morfológicas sean compatibles con la fecundación, pero que impliquen la muerte del embrión. En el hombre y el toro se ha visto que el semen que contiene espermatozoides de morfología aparentemente normal pero concentraciones anormales de ADN se acompaña de infertilidad y probablemente de casos de muerte embrionaria. Se sabe asimismo que ésta puede estar provocada por una lesión de los espermatozoides causada por los rayos X que no produce modificaciones aparentes de estructura ni de comportamiento. Por ahora, el tratamiento de las espermatogénesis anormales espontáneas no parece haber tenido gran éxito.

3.13 En muchos mamíferos, ciertos factores ambientales de carácter estacional, por ejemplo la luz y la temperatura, ejercen una influencia marcada sobre la espermatogénesis. Por otra parte, diversos factores nutricionales (ciertos aminoácidos y ácidos grasos, las vitaminas A y E, algunos oligoelementos como el zinc, etc.) son indispensables para el mantenimiento del epitelio seminal. Se sabe además que la espermato-

génesis se puede alterar profundamente por la acción de diversos factores como la hipertermia, la temperatura escrotal elevada, el « stress », la hipoxemia, los estrógenos y progestógenos, el arsénico, el cadmio, las mostazas nitrogenadas, la colchicina, los nitrofuranos, ciertos agentes alquilizantes, las radiaciones ionizantes y los antígenos testiculares. No se ha encontrado una explicación satisfactoria de los efectos de la hipertermia, pero lo que sí se sabe es que las células más sensibles son los espermatoцитos primarios en fase de paquitene. El arsénico puede ocupar el lugar del fósforo en la síntesis del ADN. La colchicina detiene la división celular en la metafase. Los agentes alquilizantes ofrecen especial interés, pues atacan específicamente a ciertas clases de células germinales. Se conoce muy mal el metabolismo del epitelio seminal.

### Los espermatozoides en el epidídimo

3.14 En el epidídimo, los espermatozoides sufren un proceso de maduración durante el cual completan su desarrollo y alcanzan la madurez funcional completa. Esta maduración implica la emigración de la gotícula citoplásmica del cuello del espermatozoide a la extremidad distal del segmento intermedio, con modificación morfológica del acrosoma y posiblemente también de las mitocondrias y con un aumento de la motilidad y de la capacidad fecundante. Se cree que los espermatozoides recién salidos de los testículos son estériles. Las transformaciones propias de la maduración parecen ocurrir sobre todo en la cabeza y en el cuerpo del epidídimo. Antes de la eyaculación los espermatozoides maduros se concentran en la cola del epidídimo y en el conducto deferente, regiones donde se encuentra la gran mayoría de los espermatozoides.

3.15 A igualdad de temperatura, los espermatozoides viven durante mucho más tiempo en el epidídimo que en el aparato genital femenino (véase el párrafo 5.5) o *in vitro*. Se ha observado que su longevidad en el epidídimo puede ser de 30 a 70 días en la rata, el conejo, el cobayo y el toro, y de muchos meses en ciertos murciélagos. No obstante, es evidente que el espermatozoide sufre antes de su muerte las modificaciones propias de la senescencia : la capacidad generadora de embriones viables se pierde antes que el poder fecundante, que a su vez desaparece antes que la motilidad. Estos efectos del envejecimiento se traducen en modificaciones de la sensibilidad del núcleo al colorante de Feulgen y por un aumento de la eosinifilia. Después de una continencia prolongada, la eyaculación suele contener una proporción muy elevada de espermatozoides muertos o degenerados, que en ciertos casos podrían ser la causa de la muerte de los embriones. No se sabe muy bien de qué forma desaparecen en el epidídimo los espermatozoides que no se han eyaculado : mientras que algunos investigadores piensan que sufren una degeneración

picnótica o que son digeridos o absorbidos, otros creen simplemente que el epidídimo los elimina por un peristaltismo normal. Se han encontrado espermatozoides en la orina de muchas especies animales y puede considerarse que este fenómeno es fisiológico.

3.16 La supervivencia de los espermatozoides en el epidídimo depende de la actividad endocrina de los testículos y disminuye mucho si se extirpan éstos o la hipófisis. Todavía se conoce mal el mecanismo de acción del epidídimo sobre la maduración y supervivencia de los espermatozoides, así como sobre los factores que pueden modificarlos.

3.17 En el epidídimo, los espermatozoides permanecen inactivos; su tránsito se hace en parte por peristaltismo y en parte gracias al aumento progresivo del calibre del conducto. En la eyaculación, los espermatozoides son expulsados del conducto deferente y de la cola del epidídimo por contracciones espasmódicas. El tiempo necesario para el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo parece oscilar entre una y tres semanas y depende de la frecuencia de las eyaculaciones. La edad de los espermatozoides eyaculados, contada a partir del momento de su salida de los testículos, también depende así de la frecuencia de las eyaculaciones. Como los espermatozoides se mezclan más o menos en el epidídimo, los emitidos en una eyaculación pueden tener distintas edades.

3.18 Nada se sabe del metabolismo de los espermatozoides en el epidídimo, pero su inmovilidad hace pensar que es muy bajo. Algunos autores creen que esto se debe sobre todo a la escasa cantidad de oxígeno y de substrato glucolizable disponibles; según otros, intervendrían ciertos inhibidores metabólicos. En la trucha, los espermatozoides del epidídimo parecen ser inhibidos por el potasio, y no hay que olvidar que en el epidídimo de los mamíferos el cociente potasio/sodio es elevado.

3.19 A veces los espermatozoides atraviesan las paredes del epidídimo e invaden los tejidos peritubulares. Este fenómeno podría deberse inicialmente a una inflamación del epidídimo, pero en realidad no se conoce bien su etiología. Tal vez resida aquí la causa de la autoinmunización contra los espermatozoides que se ha observado en algunos hombres estériles, que a veces eyaculan espermatozoides aglutinados.

3.20 En diversos puntos del epidídimo se ha observado a veces la formación de acúmulos de esperma que han sido denominados espermatocelos y que suelen deberse a una obstrucción de la luz del conducto. Los espermatozoides retenidos presentan con frecuencia un aspecto normal, pero su fertilidad está disminuida.

#### **Los espermatozoides *in vitro***

3.21 Durante la eyaculación los espermatozoides se mezclan con la secreción de las glándulas accesorias, que constituye la mayor parte del plasma

seminal. Aunque se ha estudiado a fondo la composición química de este plasma y sus efectos sobre los espermatozoides *in vitro*, se sabe poco de sus funciones fisiológicas *in vivo*.

3.22 Los espermatozoides eyaculados o tomados del conducto deferente y de la cola del epidídimo reaccionan al cambio de ambiente con un brusco aumento de la motilidad y de la actividad metabólica que les lleva con relativa rapidez al agotamiento y a la muerte. Es poco lo que se sabe sobre la naturaleza de esta activación, pero es posible que en ella intervenga, entre otros factores, el aumento de las cantidades disponibles de oxígeno y de substrato metabolizable.

3.23 Aunque se ha estudiado mucho el efecto de diversos agentes físicos y químicos sobre el metabolismo, la motilidad y la supervivencia de los espermatozoides *in vitro*, en muy pocos de estos trabajos se ha establecido una relación entre las observaciones *in vitro* y la fertilidad.

3.24 La longevidad de los espermatozoides *in vitro* varía según la especie y la naturaleza del medio utilizado; relativamente breve a la temperatura ambiente o a la del organismo, se puede prolongar por refrigeración y en ciertos casos aumentando la tensión del anhídrido carbónico. Los espermatozoides de toro conservados a  $+4^{\circ}\text{C}$  y diluidos en un medio protector conservan su poder fecundante durante varios días, pero como la fertilidad de las muestras así conservadas disminuye con el tiempo, en la práctica no se suelen utilizar para la inseminación artificial comercial las muestras conservadas durante más de tres días. Parece que esta evolución, más o menos rápida según los donantes, se acompaña de un aumento de la mortalidad embrionaria. Los espermatozoides de toro tratados con glicerina pueden conservarse durante varios años a  $-79^{\circ}\text{C}$  (nieve carbónica) o a  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido), técnica muy empleada en la actualidad para conservar los espermatozoides destinados a la inseminación artificial de las vacas. A estas temperaturas tan bajas los fenómenos de envejecimiento son muy lentos, aunque no hay que subestimar una posible actividad de los radicales libres. Los esfuerzos realizados hasta ahora para conservar espermatozoides de otras especies a baja temperatura apenas han dado resultados, pero los espermatozoides humanos resisten especialmente bien la congelación y se han podido utilizar para la inseminación artificial después de una congelación a muy baja temperatura. Algunos autores afirman haber podido conservar por liofilización los espermatozoides de toro, pero otros no han podido confirmarlo.

3.25 La resistencia de los espermatozoides a las temperaturas bajas depende en parte de la rapidez del enfriamiento. Los de toro, cuando se los congela con excesiva rapidez, mueren en gran número por un «golpe de frío». La sensibilidad de los espermatozoides a este choque varía según las especies e, incluso dentro de una misma especie, según los individuos. La

sensibilidad aumenta con la edad de los espermatozoides y se puede atenuar con ciertas sustancias protectoras, como la yema del huevo. La dilución también es perjudicial para los espermatozoides, pero sus efectos se pueden evitar con los mismos agentes que protegen contra el « golpe de frío ».

3.26 *In vitro*, los espermatozoides de los mamíferos obtienen la energía necesaria para su actividad fisiológica por tres mecanismos: 1) la glucólisis de ciertas hexosas exógenas según el mecanismo de Embden-Meyerhof; 2) la oxidación respiratoria de los productos finales de la glucólisis y de diversos substratos exógenos, siguiendo el ciclo de Krebs del ácido tricarbónico; y 3) la oxidación respiratoria de los lípidos intracelulares por el ciclo de Krebs. En presencia de oxígeno, los procesos 1) y 2) pueden desarrollarse simultáneamente, pero el segundo produce una cantidad 15 veces mayor de adenosintrifosfato (ATP) que el primero por molécula de azúcar utilizada. En condiciones de anaerobiosis sólo es posible la glucólisis, que puede constituir una importante fuente de energía para los espermatozoides en el interior del epidídimo, si bien hay datos demostrativos de que los espermatozoides epididimarios también son capaces de degradar las hexosas por la vía más directa del hexosamonofosfato. Probablemente el proceso 3) sólo tiene lugar cuando no es fácil utilizar el substrato metabólico extracelular. La importancia relativa de los metabolismos glucolítico y respiratorio parece variar algo de unas especies a otras y depende del oxígeno disponible y de otros factores peor definidos. Hay pruebas de que los espermatozoides sobreviven más tiempo cuando la respiración está restringida.

#### 4. LA OVOGENESIS Y EL OVULO

##### La reserva de ovocitos

4.1 En los mamíferos, los ovocitos primarios están ya formados en el momento del nacimiento o se forman poco después. El ovario adulto no contiene células equivalentes a las espermatogonias primitivas del testículo y no renueva sus reservas de ovocitos. Por consiguiente, cualquier factor que reduzca el número de ovocitos o impida su maduración puede mermar definitivamente la fecundidad de la hembra. Los ovocitos liberados hacia el final de la vida fértil tienen por esa razón una edad muy superior a los de los primeros años; en la mujer la diferencia es de 25 a 30 años. Sabido es que determinadas anomalías congénitas (v.g., mongolismo) son más frecuentes en los niños nacidos de mujeres de edad madura y es probable que este fenómeno esté relacionado con el envejecimiento del ovocito.

4.2 La reserva de ovocitos disminuye a causa de la degeneración masiva inicial, la continua atresia causada por la edad y, en un grado mucho menor, la ovulación periódica. Diversos agentes nocivos, especialmente las radiaciones ionizantes, pueden aumentar considerablemente las pérdidas por atresia; sin embargo, no se conocen ni las causas ni la importancia de la atresia espontánea. La pérdida de ovocitos por ovulación se acelera algo por la administración de gonadotropinas. No se sabe por qué ciertos folículos se desarrollan y dan lugar a una ovulación mientras que otros involucionan antes de completar su desarrollo o incluso no llegan a desarrollarse.

#### **Desarrollo del ovocito**

4.3 Los ovocitos primarios de los mamíferos alcanzan rápidamente la profase de la primera división meiótica y entran en la fase de diplotene al final del desarrollo fetal o poco después del nacimiento; a partir de ese momento se detiene el desarrollo nuclear. El aspecto de los núcleos diplotenes de los ovocitos en reposo varía mucho según las especies (baste citar, por ejemplo, el diplotene «típico» del ovocito humano, el diplotene condensado del cobayo y el núcleo difuso del ovocito dictiado de la ratona y de la rata, de aspecto análogo al de la interfase). En todas las especies el ovocito aumenta rápidamente de tamaño cuando el folículo empieza a desarrollarse; los cromosomas adquieren una apariencia tintorial oxífila y el aspecto de «escobilla limpiálámparas», pero persisten las diferencias de estructura nuclear características de las especies. Durante las últimas fases del desarrollo folicular los cromosomas se condensan y entran en diaquinesis. Poco antes de la ovulación termina la primera división meiótica y se forman el ovocito secundario y el primer glóbulo polar. Rápidamente empieza la segunda división meiótica, que se detiene en la metafase, que es cuando se produce la ovulación en la mayor parte de los mamíferos. En general, esta segunda división no se termina hasta que el espermatozoide activa al ovocito. Así, pues, en la hembra del mamífero no se encuentran células germinales haploides equivalentes a las espermátides y a los espermatozoides del macho. En la perra y en la zorra la ovulación se produce en la fase de ovocito primario y los glóbulos polares se forman en el oviducto.

4.4 Los estudios efectuados en equinodermos y anfibios han demostrado que la ovogénesis se acompaña de una síntesis activa de material ribosómico y de ARN mensajero, que cesa al final del desarrollo del ovocito. El empleo de precursores radiactivos del ARN ha permitido demostrar que las moléculas marcadas aparecen en primer lugar en el nucléolo, después en la cariolinfa y por último en el citoplasma, permaneciendo en este último asociadas a los ribosomas, que se mantienen inactivos hasta después

de la fecundación. El compuesto marcado sigue una trayectoria similar en los ovocitos de la ratona, donde la uridina se incorpora rápidamente a los ovocitos de los folículos en crecimiento, pero no penetra en los ovocitos de los folículos con antrós bien desarrollados. En los ovocitos de la rata y de la ratona, el ARN se distribuye unilateralmente en el citoplasma, mientras que en las células foliculares adyacentes se observa un acúmulo equivalente de ARN.

#### **Desarrollo del folículo**

4.5 No se conoce la cronología exacta del desarrollo folicular de ningún mamífero. Las observaciones sobre las fases sucesivas del desarrollo en hembras jóvenes no son muy demostrativas, pues en ellas existe siempre una atresia folicular considerable y es posible también que la rapidez del desarrollo no sea la misma en el animal joven que en el adulto. Los experimentos de destrucción de determinadas fases del desarrollo de los folículos en adultos son asimismo equívocos, pues estas maniobras pueden afectar el desarrollo de otros folículos. No obstante, lo que está claro es que el tiempo necesario para que un folículo primario se desarrolle hasta la madurez es mucho mayor que la duración de un ciclo menstrual, y no igual como antes se creía. En la ratona adulta la exposición aguda a una dosis de 50R de rayos X destruye todos los ovocitos jóvenes, pero la fertilidad del animal se mantiene durante 60 ó 70 días, con un promedio de 4 camadas por hembra. Estas gestaciones se hacen a partir de los ovocitos que en el momento de la irradiación estaban protegidos por varias capas de células foliculares. En la mujer, una irradiación moderada puede ser seguida de un pequeño número de ovulaciones, más tarde de un periodo anovulatorio y, por último, del restablecimiento del ciclo. Se precisan varios meses para que se desarrollen los folículos maduros a partir de los folículos primordiales supervivientes de los que existían en el momento de la irradiación. Si fuese cierto que en un solo ciclo menstrual puede desarrollarse totalmente el folículo humano, no habría periodo anovulatorio después de la irradiación. En la rata se ha demostrado que el número de folículos estimulables por la gonadotropina exógena está en relación con el número de folículos primordiales existentes en el ovario.

4.6 No se conocen bien los factores que regulan el desarrollo folicular y la ovulación, y *la imposibilidad de predecir el momento de la ovulación sigue constituyendo una importante laguna en nuestros conocimientos sobre la reproducción humana.*

#### **El óvulo después de la dehiscencia**

4.7 Tras la ovulación, el óvulo del mamífero se rodea de una espesa envoltura denominada zona pelúcida. Esta zona empieza a formarse en los folículos como una simple capa de células cuboideas e inicialmente

adopta el aspecto de una estructura intercelular discontinua en la que cada elemento está relacionado con una célula folicular. Parece probable que la zona sea un producto de las células foliculares más que del propio ovocito. Tanto en éste como en aquéllas se observan unas microvellosidades que penetran en la zona y que sin duda facilitan el intercambio de metabolitos entre el ovocito y el medio exterior. En una fase ulterior del desarrollo folicular va disminuyendo el tamaño de las microvellosidades y probablemente se reduce también el paso de sustancias a través de la zona; es posible incluso que la interrupción del metabolismo del ARN en el ovocito esté relacionada con la desaparición de las microvellosidades de la zona.

4.8 La zona pelúcida se mantiene inicialmente en estrecho contacto con el ovocito, pero al formarse el primer glóbulo polar va apareciendo un espacio perivitelino. La zona está constituida por mucoproteínas. En muchas especies, los ácidos y las enzimas proteolíticas pueden provocar su disolución; en cambio, es resistente a la hialuronidasa. Ciertas observaciones recientes indican que también contiene ácido siálico.

4.9 La zona pelúcida está a su vez rodeada de células foliculares que se disponen en una capa interior regular y tupida, la *corona radiata*, y de una masa exterior irregular y laxa, el *cumulus oophorus*. La sustancia intersticial de éste se compone principalmente de ácido hialurónico y es muy sensible a la acción de la hialuronidasa y de los extractos de espermatozoides. Cuando el óvulo pasa por el oviducto, las células del *cumulus* y de la *corona* se dispersan con más o menos rapidez, según las especies: muy deprisa en la yegua, la oveja y la vaca, y con lentitud en la coneja, los roedores y los carnívoros.

4.10 La fertilidad del óvulo, es decir, su capacidad para responder a la impregnación por el espermatozoide con la formación de un embrión normal, dura muy poco tiempo después de la ovulación. Las observaciones efectuadas en la rata, el hámster, la cobaya, la coneja, la cerda, la hurona, la oveja y la vaca dan cifras comprendidas entre 10 y 20 horas, que probablemente son aplicables a todos los demás mamíferos. Los óvulos más viejos presentan con frecuencia anomalías de fecundación y desarrollo: la frecuencia de la poliespermia y de la retención del segundo glóbulo polar, por ejemplo, aumentan con la edad del óvulo. En la mayor parte de los mamíferos, la relación cronológica entre la inseminación y la ovulación está regulada por un periodo limitado de celo o por el propio apareamiento, que provoca la ovulación; pero en la especie humana y en algunos otros primates no sucede así, y la fertilización de huevos envejecidos puede ser una causa importante de mortalidad embrionaria. Las modificaciones de la trompa consecutivas a variaciones de la actividad ovárica pueden influir mucho en la duración de la vida fértil del óvulo.

**El óvulo *in vitro***

4.11 Los ovocitos de mamífero artificialmente separados del folículo pueden seguir desarrollándose *in vitro* si las condiciones de cultivo son adecuadas; en tales casos su maduración evoluciona del mismo modo que *in vivo*. Los ovocitos madurados *in vitro* pueden quedar fecundados al parecer normalmente, cuando se les transfiere a una hembra apareada.

4.12 Se ha logrado mantener *in vitro* ovocitos de coneja ovulados durante tres o cuatro días a temperaturas comprendidas entre 0° C y 10° C, pero la mortalidad de los embriones después de su trasplante a una hembra cubierta aumenta en proporción directa al tiempo de conservación *in vitro*. Por ahora no se han podido conservar los óvulos a temperaturas muy bajas. No obstante, los ovocitos incluidos en cortes de ovario pueden sobrevivir durante mucho tiempo a temperaturas sumamente bajas (— 79° C) después de un tratamiento con glicerina y se han obtenido crías normales con injertos ortotópicos de ovarios tratados de esta manera.

**5. LA FECUNDACION Y LAS PRIMERAS FASES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO****Preliminares de la fecundación**

5.1 En varias especies de mamíferos los espermatozoides pueden alcanzar el punto de fecundación en el oviducto durante los quince minutos siguientes a la inseminación. Este rápido tránsito se debe en parte a la actividad muscular del aparato reproductor femenino, pero también pueden influir en él el lugar elegido para la inseminación y otros factores como el *stress* y la fase del estro. La llegada de espermatozoides al oviducto se mantiene durante algún tiempo a partir de las zonas inferiores del aparato genital.

5.2 La motilidad del propio espermatozoide puede asimismo contribuir a su desplazamiento a través del cervix (v.g., en las especies con inseminación intravaginal) y de la unión uterotubárica, y probablemente es esencial para que el espermatozoide se ponga en contacto con el óvulo y atraviese la zona pelúcida.

5.3 A pesar de que la eyaculación normal comprende un número muy elevado de espermatozoides, en los oviductos sólo se suelen encontrar algunos centenares o miles en un momento dado. Esta drástica reducción del número de espermatozoides que alcanzan el lugar de fecundación es un factor que contribuye probablemente mucho a reducir la frecuencia de la poliespermia, es decir la presencia de más de un espermatozoide dentro del citoplasma del óvulo.

5.4 En algunas plantas primitivas el óvulo atrae a los gametos masculinos mediante ciertas sustancias que difunde, es decir por un fenómeno de quimiotaxis. No hay pruebas claras de que en los animales se produzca un fenómeno análogo. Es posible que en determinadas especies la masa de células del *cumulus* que rodea al óvulo después de la ovulación facilite el contacto entre el espermatozoide y el óvulo.

5.5 En el aparato genital femenino los espermatozoides suelen sobrevivir muy poco tiempo; unas 6 horas en la ratona, 14 en la rata, 22 en la cobaya, 30 en la coneja, 2 días en la mujer, la oveja y la vaca, 3 días en la cerda, 5 días en la hurona y 6 días en la yegua. Ciertos murciélagos constituyen una notable excepción a esta regla, ya que los espermatozoides activos pueden sobrevivir varios meses *intra utero*; no se conocen las causas de esta excepcional longevidad. Las observaciones hechas en animales domésticos y de laboratorio indican que la vida del espermatozoide varía según la región del aparato genital femenino y la fase del ciclo estral. En las gallinas, donde los espermatozoides de cada apareamiento sobreviven normalmente durante muchos días y fecundan a sucesivos óvulos según van pasando por el oviducto, se ha demostrado que los espermatozoides más viejos son causa de malformaciones embriónicas. No se han hecho observaciones análogas en mamíferos, en los que la consecuencia más clara del envejecimiento de los espermatozoides en el aparato genital femenino parece ser la pérdida de su poder fecundante.

#### **Penetración del espermatozoide en el óvulo**

5.6 Hoy se sabe que, en los mamíferos, la fecundación no requiere la eliminación previa del *cumulus oophorus* y de la *corona radiata*. Los espermatozoides son capaces de abrirse camino entre las células del *cumulus*, probablemente gracias a la hialuronidasa que contienen; la penetración en la zona pelúcida parece deberse a la « zona lisina » que, como la hialuronidasa, se localiza probablemente en el acrosoma. Los espermatozoides atraviesan rápidamente la zona, dejando a su paso pequeños conductos. La cabeza del espermatozoide atraviesa rápidamente el espacio perivitelino y se fija a la membrana plasmática del óvulo; no se conoce bien la naturaleza de esta unión. A continuación el espermatozoide penetra lentamente en el citoplasma : en algunas especies entra todo el espermatozoide, en otras lo hace sólo la cabeza mientras que la cola se queda en el espacio perivitelino, y en las restantes unas veces entra todo el espermatozoide y otras sólo la cabeza. Es evidente que la entrada de la cola no siempre es necesaria para la fecundación del mamífero; lo que no se sabe con precisión es si algunos elementos de la cola, como las mitocondrias y las estructuras centriolares, tienen una función importante

en la formación del embrión en algunas especies. Ciertos estudios recientes con el microscopio electrónico indican que las mitocondrias del espermatozoide permanecen inactivas cuando éste entra en el citoplasma ovular.

5.7 En ciertos invertebrados, al aproximarse el espermatozoide al óvulo, se desprende del acrosoma un filamento tubular (« reacción acrosómica ») que establece contacto con el óvulo y facilita la penetración del espermatozoide. La reacción acrosómica está desencadenada por ciertas sustancias (« fertilizinas ») procedentes de la envoltura del óvulo y que, en solución, aglutinan los espermatozoides. Diversas observaciones demuestran que los óvulos de coneja pueden producir una sustancia que aglutina los espermatozoides.

5.8 En varios mamíferos se ha observado que el espermatozoide no penetra en la zona pelúcida mas que después de haber permanecido una hora aproximadamente dentro del conducto genital femenino y es probable que éste sea el caso de todos los mamíferos. Es, pues, evidente que el espermatozoide sufre cambios que lo ponen en condiciones de atravesar la zona; estos cambios han sido denominados « capacitación ». Se desconoce la naturaleza de la capacitación, pero es probable que en ella intervenga el acrosoma; parece ser, en efecto, que las modificaciones del acrosoma liberan o exponen las enzimas necesarias para la penetración de la zona. Los espermatozoides observados dentro de la zona pelúcida o del espacio perivitelino muestran profundas modificaciones de su estructura acrosómica que probablemente están relacionadas con la capacitación y son análogas a la mencionada reacción acrosómica.

5.9 El hecho de que ciertos toros y verracos con una malformación acrosómica de origen genético sean totalmente estériles muestra la importancia del acrosoma en la fecundación de los mamíferos. Aparte de su defecto acrosómico, los espermatozoides de estos animales parecen normales, pero son incapaces de fecundar los óvulos.

5.10 El mecanismo de la fijación de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del óvulo es desconocido; antes se pensaba que la entrada del espermatozoide en el citoplasma se hacía por un proceso análogo a la fagocitosis, pero después se ha visto que en el citoplasma ovular el espermatozoide no está dentro de una estructura vesicular como sería el caso si hubiese sido fagocitado. Ciertas observaciones recientes apenas dejan duda de que la penetración se hace mediante un proceso de fusión de membranas: la membrana del espermatozoide se funde con la membrana citoplasmática del óvulo y el espermatozoide penetra lentamente en el citoplasma.

5.11 En la mayor parte de las especies, el éxito de la fecundación depende de que un sólo espermatozoide entre en el citoplasma ovular; cuando hay poliespermia no se obtiene un desarrollo normal. El mecanismo de la monoespermia es complejo y varía de unas especies a otras. En el erizo

de mar, la entrada del espermatozoide fecundante va rápidamente seguida de la formación de una «membrana de fecundación» que impide la entrada de nuevos espermatozoides; la formación de esta membrana es consecutiva a la rotura de los gránulos corticales del citoplasma ovular. En los mamíferos, el contacto del espermatozoide con la membrana plasmática ovular va seguido de una rápida reacción de ésta con rotura de sus gránulos corticales, es decir de un proceso muy similar al que se observa en el erizo de mar. Se supone que las sustancias liberadas por los gránulos corticales se difunden por el líquido perivitelino, alterando la estructura de la zona pelúcida. En la ratona, la rata y la coneja, la tripsina digiere más fácilmente la zona antes que después de la penetración del espermatozoide. En algunas especies la membrana plasmática ovular se hace rápidamente impermeable a los demás espermatozoides, mientras que en otras es la transformación rápida de la zona pelúcida la que impide la poliespermia. La coneja, ciertas hembras de la familia *Ochotonidae* y la hembra del topo son otras tantas excepciones, pues en ellas no existe esta «reacción de la zona»; en estas especies pueden entrar en la zona pelúcida numerosos espermatozoides, que se reúnen en el espacio perivitelino, pero luego no pueden penetrar en el citoplasma, que previamente ha sufrido ciertas transformaciones superficiales. La rapidez de la reacción de la zona pelúcida varía según las especies: mientras que en algunas es muy raro encontrar espermatozoides en el espacio perivitelino, en otras no es infrecuente encontrar un escaso número de ellos.

5.12 En la rata, la cobaya, el hámster, la cerda, la oveja y la vaca, la eficacia de los mecanismos de la monoespermia disminuye a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la ovulación, y en la rata y en la ratona ha podido observarse que disminuye también con la hipertermia.

5.13 En algunos casos se ha conseguido fecundar *in vitro* los óvulos de la coneja y del hámster después de la ovulación, cultivándolos con espermatozoides tomados del aparato genital femenino; estos óvulos, una vez transferidos a hembras adecuadas, han producido crías vivas. En cambio, han fracasado otras muchas tentativas de fecundación *in vitro*, especialmente cuando se ha prescindido de la «capacitación» previa del espermatozoide. El cultivo *in vitro* de los óvulos de coneja fecundados sólo ha sido posible hasta el comienzo de la fase de blastocisto, pues a partir de ese momento los embriones se colapsan y se desorganizan. Los resultados obtenidos con óvulos de otras especies son menos satisfactorios: por ahora no se han podido cultivar los huevos unicelulares de ratona, pero, en cambio, se han podido llevar hasta la blástula las mórulas de cuatro y ocho células. No se conocen bien las necesidades culturales de los óvulos de los mamíferos, pero el perfeccionamiento de las técnicas de cultivo facilitará probablemente y en una medida considerable el estudio de numerosos problemas.

**Activación del huevo**

5.14 Un aspecto esencial de la fecundación es la activación del óvulo fecundado, gracias a la cual éste puede transformarse en embrión. Aun cuando la ruptura de los gránulos corticales no parece ser un fenómeno universal en el reino animal, en numerosas especies constituye el primer signo de activación y parece estar directamente relacionada no sólo con los fenómenos que impiden la poliespermia sino también con la eliminación de los mecanismos inhibidores del desarrollo en el citoplasma. Este desarrollo se inicia rápidamente por la formación de pronúcleos a partir de los elementos nucleares del óvulo y del espermatozoide.

5.15 En los mamíferos el huevo efectúa rápidamente su segunda división meiótica después de la entrada del espermatozoide y la formación del segundo glóbulo polar. El volumen del citoplasma disminuye ligeramente, se produce cierta reordenación de los elementos nucleares y citoplasmáticos y se forman los pronúcleos masculino y femenino. Los pronúcleos se desarrollan rápida y simultáneamente, y toda interferencia en el desarrollo de uno de ellos afecta también al otro. Aunque se aproximan, permanecen intactos hasta la condensación de los cromosomas que precede a la singamia. Su estructura, y en especial la formación y el comportamiento de los nucléolos, indican que estos pronúcleos son metabólicamente activos desde sus primeras fases de desarrollo.

5.16 Antes se creía que el óvulo no fecundado tenía un metabolismo respiratorio reducido y que la primera consecuencia de la activación era la normalización de la actividad respiratoria. Aunque este parece ser el caso del erizo de mar y de algunas otras especies, no sucede lo mismo en la mayor parte de los animales estudiados. Así, por ejemplo, no se observa ninguna modificación respiratoria consecutiva a la fecundación en los huevos de los peces y los anfibios, y su consumo de oxígeno no aumenta hasta la fase de blástula. En ciertas especies se observa incluso una disminución temporal de la actividad respiratoria después de la fecundación. No obstante, la medición del consumo de oxígeno no es muy demostrativa y es probable que no sea mucho más fructífero el estudio directo de los sistemas energéticos. Ciertas observaciones hechas recientemente en el erizo de mar autorizan a pensar que durante la ovogénesis se produce un bloqueo del metabolismo de los hidratos de carbono, y en consecuencia de la síntesis de ATP, que desaparece durante la fecundación.

5.17 El empleo de compuestos radioactivos ha permitido demostrar que la permeabilidad de las membranas de ciertos invertebrados marinos a los aminoácidos, hidratos de carbono y fosfatos es muy escasa antes de la fecundación y después aumenta mucho. En el caso del fosfato, hay pruebas de que la fecundación pone en marcha un sistema de transporte

específico. Nada se sabe sobre las modificaciones en la velocidad de penetración de diversas sustancias en los huevos de los mamíferos después de la fecundación. Sin embargo, la glucosa y el malato favorecen el desarrollo *in vitro* de los huevos de 8 células de la ratona, pero no el de los de 2 células; esta diferencia podría deberse a la activación de los sistemas enzimáticos en el propio embrión, a la mayor o menor facilidad con que penetran en éste los substratos o a ambos fenómenos a la vez. Si se dispusiera de nuevos y mejores métodos de cultivo *in vitro* de huevos de mamífero se habría dado un gran paso hacia la solución de esta clase de problemas.

5.18 Ciertas observaciones indican que el óvulo no fecundado contiene en forma inactivada o parcialmente activada las enzimas que intervienen en las primeras fases de la embriogénesis, o bien los programas que rigen su síntesis, en forma inactiva. En el erizo de mar parece ser que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se solubiliza en los cinco minutos siguientes a la penetración del espermatozoide. Es posible que esta transformación se deba a una redistribución de los iones en el citoplasma; hoy se sabe, por ejemplo, que el potasio se halla sobre todo en forma no intercambiable antes de la fecundación y en forma intercambiable después de ésta. No obstante, la enzima que produce la eclosión del huevo en el erizo de mar no parece existir en el óvulo no fecundado, mientras que en él se encuentra ya ARN mensajero.

5.19 En numerosos animales el óvulo no fecundado tiene la particularidad de contener en su citoplasma ADN en una cantidad varias veces superior a la del núcleo. Ciertas observaciones recientes autorizan a pensar que el ADN citoplasmático tiene propiedades análogas a las del ADN nuclear; aunque se ignora su localización precisa y sus funciones, es posible que proporcione la información genética preliminar en las primeras fases del desarrollo embrionario, o que constituya una reserva de nucleótidos para la síntesis del ADN nuclear. En el erizo de mar no se observa un aumento neto en la cantidad de ADN que contiene el embrión durante las primeras divisiones. Tampoco hay prueba alguna de que se acumule ADN en el citoplasma de los óvulos de mamíferos.

5.20 Una característica importante del óvulo no fecundado es su incapacidad para sintetizar las proteínas a causa, según parecen indicar ciertas observaciones, de la influencia frenadora de los ribosomas. Los ribosomas de los huevos de erizo de mar recién fecundados pueden transformar *in vitro* los aminoácidos en proteínas, mientras que los ribosomas de los óvulos no fecundados no pueden hacerlo. Ciertas observaciones recientes parecen confirmar la hipótesis de que el ARN mensajero está unido a los ribosomas ya en el óvulo no fecundado, pero que este complejo permanece inactivo a causa de una envoltura proteica. La digestión *in vitro* de esta envoltura por la tripsina restituye su actividad a los

ribosomas y es posible que durante la fecundación tenga lugar un proceso análogo. Efectivamente, en el huevo del erizo de mar se ha observado una activación temporal de las proteasas durante la fecundación.

5.21 En los peces, anfibios y equinodermos, el ARN (tanto el de los ribosomas como el mensajero) sintetizado durante la ovogénesis es utilizado por el embrión aproximadamente hasta la fase de gástrula. Por consiguiente, durante todo este tiempo la síntesis de las proteínas está regida, al menos en gran parte, por el ARN sintetizado durante la ovogénesis. En consecuencia, la buena marcha de las primeras fases del desarrollo embrionario parece depender, entre otros factores, de los acontecimientos que influyen sobre la síntesis del ARN durante la ovogénesis. Al parecer, el huevo recién fecundado está bien preparado para sintetizar las proteínas que precisará durante las primeras fases de su desarrollo.

5.22 Los embriones híbridos no viables de los equinodermos y los anfibios se desarrollan más o menos normalmente al principio pero nunca pasan de la fase de gástrula. Lo mismo se ha observado en los embriones expuestos a grandes dosis de rayos X o en los que se ha inhibido la actividad nuclear con actinomicina-D. En la ratona, no obstante, la actinomicina-D interrumpe el desarrollo del huevo antes de que éste alcance la fase de 8 células, lo que parece indicar que en los mamíferos el ARN mensajero sintetizado durante la ovogénesis sólo regula el desarrollo embrionario durante las dos o tres primeras divisiones.

5.23 El desarrollo requiere más pronto o más tarde la información genética primaria contenida en el núcleo del cigoto, cuya utilización exige a su vez la actividad metabólica de un nuevo ARN mensajero y de nuevos ribosomas. Las observaciones hechas en embriones de equinodermos y de anfibios, indican que el nuevo ARN mensajero empieza a sintetizarse muy poco tiempo después de la fecundación, pero no se utiliza hasta una fase muy posterior del desarrollo embrionario. Aunque no se sabe por qué mecanismo se conserva el ARN y, en el momento oportuno, se metaboliza, el sistema que desencadena estos procesos es sin duda un factor regulador esencial de la diferenciación. Cada vez hay más datos demostrativos de que la transcripción genética precede bastante a la utilización efectiva de los productos genéticos, detalle de gran interés aun cuando no se conozca todavía su significación exacta.

5.24 En los óvulos de peces irradiados con rayos X inmediatamente antes de la fecundación, la síntesis de ARN rápidamente marcado (probablemente ARN mensajero) se prosigue aunque cese la síntesis de ADN y en los híbridos no viables de equinodermos se ha hecho una observación análoga. Es posible que este ARN sea una forma aberrante que provoca después la detención del desarrollo por dar lugar a la síntesis de una proteína aberrante o por la imposibilidad de «descifrar» su mensaje transmitido.

5.25 Hay pruebas de que el nucléolo interviene en la síntesis del ARN ribosómico. Tanto en los anfibios como en los equidermos la síntesis del ARN en los ribosomas se inicia en el momento en que aparece un gran nucléolo en las células embrionarias. Los mutantes anucleolados de *Xenopus* no pueden sintetizar el ARN ribosómico, mientras que elaboran normalmente el ARN mensajero y el ARN de transferencia. Ciertas observaciones efectuadas en la ratona indican que los nucléolos participan en la síntesis del ARN desde que el huevo tiene 4 células: se cree que este ARN es ribosómico porque está asociado al nucléolo y porque se sabe que el ARN del cigoto interviene en el metabolismo desde que se inicia el desarrollo (véase el párrafo 5.22).

5.26 Es evidente que los factores que influyen en la elaboración y la actividad de las claves ADN, así como en su transcripción en claves ARN y sobre el desciframiento de estas últimas para la síntesis de proteínas específicas tienen una función importante en el desarrollo embrionario. Para aclarar los procesos fundamentales y conocer los riesgos a que está expuesto el embrión, habrá que estudiar detenidamente tanto la gametogénesis como la embriogénesis.

## 6. INVESTIGACIONES NECESARIAS

El Grupo Científico considera que los temas de investigación que a continuación se indican son los que plantean problemas más urgentes. El orden en que se exponen coincide con el seguido en el presente informe; las cifras entre paréntesis remiten a los párrafos correspondientes.

1. Morfogénesis de las gónadas, particularmente en los primates y con especial referencia a las células germinales primordiales (2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5).

2. Intervención de los sistemas nervioso y endocrino y de otros factores en el desarrollo y el mantenimiento del epitelio seminal (3.1; 3.13).

3. Citología de la espermatogénesis; gonias primitivas (3.2), fase meiótica prolongada de los espermatocitos primarios (3.4), núcleo de las espermátides (3.5), coordinación en el epitelio seminal (3.3) y degeneración de las células germinales (3.11).

4. Biología de las células de Sertoli; sus funciones en la espermiogénesis, separación de las espermátides del epitelio seminal y posible actividad secretoria de estrógenos de las células de Sertoli (3.8; 3.9).

5. Efectos del envejecimiento de las células germinales y sus repercusiones sobre la fertilidad (3.10; 3.15; 3.24; 4.1; 4.10; 4.12).

6. Génesis de los espermatozoides anormales, evolución de su capacidad fecundante y posibles tratamientos de la espermiogénesis anormal (3.12).

7. Biología del epidídimo; maduración, metabolismo, supervivencia y eliminación de los espermatozoides, y estudio de los agentes que pueden influir sobre estos procesos (3.14; 3.15; 3.16; 3.17; 3.18).

8. Mecanismos de la autoinmunización contra los espermatozoides (3.19).

9. Funciones biológicas del plasma seminal; supervivencia, tránsito, capacitación y fertilidad de los espermatozoides (3.21; 3.22).

10. Modificaciones de los espermatozoides *in vitro* relacionadas con variaciones de la fertilidad y diferencias interespecíficas en la resistencia de los espermatozoides a la conservación a bajas temperaturas (3.23; 3.24; 3.25).

11. Detención del desarrollo del ovocito en la fase de diplotene; desarrollo folicular y atrepsia, ovulación y predicción del momento de la ovulación en la mujer (4.2; 4.3; 4.4; 4.5; 4.6; 4.11).

12. Relaciones entre el ovocito y las células foliculares, formación y estructura de la zona pelúcida, y función de las «microvellosidades» (4.7; 4.8; 4.9).

13. Cultivo *in vitro* de los óvulos de mamíferos y estudio *in vitro* de su maduración, fecundación y primera fase del desarrollo embrionario (4.11; 4.12; 5.13; 5.17).

14. Factores que influyen sobre el tránsito, la conservación y la viabilidad de los espermatozoides en el aparato genital de la mujer (5.1; 5.2; 5.3; 5.5); posibilidad de un comportamiento quimiotáctico de los espermatozoides y otros factores que pueden intervenir en el encuentro espermio-óvulo (5.4; 5.7).

15. Capacitación y reacción acrosómica en los mamíferos (5.8), mecanismos de la monoespermia (5.3; 5.11; 5.12) y función del perforatorium (3.6).

16. Activación del huevo y fecundación; gránulos corticales (5.11; 5.14), bloqueo de la formación de glóbulos polares (4.13; 5.14), pronúcleos (5.15), sistemas energéticos (5.16), modificaciones de la permeabilidad de las membranas (5.17), activación de las enzimas (5.18), síntesis de proteínas (5.20) y síntesis de ARN (5.21; 5.26) y de ADN (5.19; 5.24).

17. Funciones del ADN citoplasmático (5.19).

18. Producción de embriogénesis anormales por acción sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos en las células germinales, los cigotos y los embriones en las primeras fases de desarrollo (5.26).

19. Sensibilidad de las células germinales a las radiaciones ionizantes.