

**REAL ACADEMIA DE DOCTORES  
DE ESPAÑA**

**“EL EMBRIÓN: SER VIVO,  
FRUTO DE LA REPRODUCCIÓN  
O DE LA BIOTECNOLOGÍA,  
EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS  
Y EN LA ESPECIE HUMANA”**

DISCURSO PRONUNCIADO POR EL  
**EXCMO. PROF. DR. D. EMILIO ESPINOSA VELÁZQUEZ**

EN LA TOMA DE POSESIÓN  
COMO ACADÉMICO NUMERARIO  
EL DÍA 23 DE JUNIO DE 2010

Y CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO  
**EXCMO. PROF. DR. D. FÉLIX PÉREZ Y PÉREZ**

MADRID  
MMX

Depósito Legal: Z-2102-2010

Imprime: Gorfisa. Menéndez Pelayo, 4. 50009 Zaragoza

# ÍNDICE

Palabras de salutación .....	5
I.- Evolución histórica de la reproducción y sus tecnologías.....	7
II.- Reconocimiento Maternal de la Gestación en los animales domésticos.....	13
II.1.- Mecanismos de R.M.G. ....	16
II.2.- Productos implicados en el RMG .....	17
II.3.- Desarrollo embrionario.....	24
II.4.- Reconocimiento precoz de la gestación.....	26
II.5.- Relaciones embrionario-uterinas.....	28
II.6.- Cuerpo lúteo de ciclo y de gestación .....	31
II.7.- Implantación .....	36
II.8.- Inmunología de la gestación. ....	38
III.- Biotecnologías embrionarias en los animales domésticos .....	43
III.1.- Maduración ovocitaria: M.I.V. ....	44
III.2.- Obtención y selección de ovocitos.....	45
III.3.- Capacitación espermática .....	46
III.4.- Fecundación in vitro (F.I.V.) .....	47
III.5.- Transplante de embriones (T.E.).....	49
III.6.- Congelación de embriones .....	49
IV.- Nuevas biotecnologías en reproducción. ....	53
IV.1.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	53
IV.2.- Tecnología del cultivo embrionario.....	54
IV.3.- Criopreservación de ovocitos y embriones .....	55
IV.4.- Vitrificación .....	57
IV.5.- Open Pulled Straw (OPS).....	58
IV.6.- Métodos de producción de embriones.....	59
IV.7.- Diagnóstico preimplantatorio (DPI).....	60
IV.8.- Determinación de sexo en embriones .....	61
IV.9.- Clonación de embriones (CE) .....	63
IV.10.- Transgénesis.....	66
IV.11.- Control de sexo y triploidización .....	67
V.- Reflexión general .....	69
VI.- Embrión y bioética .....	79
VII.- Conclusión.....	85
VIII.- Bibliografía .....	87
Discurso de contestación del Excmo. Prof. Dr. D. Félix Pérez y Pérez .....	103



Excelentísimo Sr. Presidente,  
Excelentísimos Señoras y Señores Académicos  
Señoras y Señores:

Es para mí un gran honor optar hoy a ser recibido en la Real Academia de Doctores de España y una enorme responsabilidad compartir un sitio en esta Academia, por la relevancia y prestigio de las personalidades que la integran.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los miembros de esta Ilustre Institución por su decisión de elegirme Académico de Número, al considerar con una magnánima evaluación mis méritos y otorgar el voto favorable a mi candidatura.

Agradecimiento especial a los Excelentísimos Académicos que me apoyaron, avalaron y consideraron digno de formar parte de esta Real Academia: D<sup>a</sup>. María Ruiz Trapero, D. Luis Mardones Sevilla y en especial a mi maestro el Profesor D. Félix Pérez y Pérez, por el afecto, amistad y apoyo que me ha demostrado a lo largo de los años y que además hoy tengo el honor de que sea él quien responda a mi discurso de ingreso.

El profesor Pérez y Pérez ha sido un referente en mi formación, no sólo en el ámbito académico, sino como profesor y como persona, desde el año 1965 cuando, como alumno de las materias que impartía, entré a formar parte de su grupo de trabajo en Reproducción Animal, siendo un ejemplo de vocación y dedicación universitaria.

No es una cuestión protocolaria sino un deber, hacer mención de quien ocupó anteriormente la Medalla 110, el Dr. D. Carlos Barros Santos, figura insigne de la profesión veterinaria, profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas; intervino de forma importante en el Código Alimentario Español y en la Comisión Interministerial para la

ordenación y legislación alimentaria, y es un reconocido experto en: ciencia y tecnología de los alimentos, derecho alimentario y consumo, siendo además Profesor Honorario de la Universidad Autónoma de Madrid.

Hoy es un día que me honra de satisfacción, pues supone la culminación de la trayectoria que inicié al obtener en 1968 el grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Zaragoza. Desde entonces, gracias a todas las Instituciones en las que he desarrollado mi actividad profesional: Instituto Agronómico Mediterráneo, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria y, en especial, al Departamento de Patología Animal, a las Cátedras de Cirugía y Reproducción y a todos los compañeros y colaboradores de las mismas, con los que comparto y he compartido mi actividad universitaria y gracias a los cuales hoy estoy aquí.

Especial mención de agradecimiento a mi familia, por su apoyo y enorme comprensión en mi dedicación profesional a lo largo de estos 40 años, en especial a Julia, en la que siempre encontré ayuda y cariño, y a mis hijos: Ignacio, Marta y Gonzalo, quienes saben apreciar la labor de una madre excepcional, cuyos valores sabrán transmitir junto a María y Sergio, a nuestros nietos Beatriz, Carlos y a la niña que está en camino. Así como a todos los demás familiares y amigos, que saben que están hoy presentes conmigo.

Gracias, a todas las personas que me acompañan en este acto y gracias, sobre todo, por el apoyo y el afecto que con su presencia me honran.

En este discurso de ingreso en la Real Academia de Doctores de España, intentaré resumir algunos aspectos sobre el Embrión, como ser vivo fruto de la reproducción o de la biotecnología, tanto en los animales domésticos como en la especie humana, procurando hacer una reflexión general y crítica, sobre aspectos relacionados con el embrión y la bioética.

## **EL EMBRIÓN: SER VIVO, FRUTO DE LA REPRODUCCIÓN O DE LA BIOTECNOLOGÍA, EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS Y EN LA ESPECIE HUMANA**

### **I.- Evolución histórica de la reproducción y sus tecnologías**

Cuando el hombre se liberó de las limitaciones del primate, accedió al mundo de los símbolos, conceptos y cultura, se preguntó sobre su origen y su situación en relación a los otros seres vivos, intentando analizar los misterios de la procreación.

Muy pronto, consideró intuitivamente su posición privilegiada y que algo le diferenciaba de los otros seres vivos y que denominó "el Alma". Antes de saber que la ontogénesis reproducía, morfológicamente, determinadas características de la filogénesis, se admitió una evolución progresiva en el curso de la gestación y Aristóteles planteó una ontogénesis del alma que se correspondía a la del cuerpo, fijando la "forma humana" en el día 40 para los varones y en el día 80 para las mujeres. En la antigüedad, se presuponía que el feto hasta que no estaba perfectamente formado, no se consideraba "ser humano" y no podía recibir la forma humana del alma; esta tesis fue sostenida por San Agustín y fue la que prevaleció durante la Edad Media gracias a la autoridad de Santo Tomás. La posición teológica actual se inclina más por la animación inmediata: estudia al embrión con una visión unitaria en la que no hay primero una materia biológica que recibe después un alma, sino un ser humano en desarrollo progresivo.

La Reproducción es tan antigua como el origen de las especies incluida la humana, pero el concepto actual de Reproducción no apareció hasta finales del siglo XVIII y se utilizó para indicar la formación de seres vivos, los cuales, hasta entonces, se pensaba que eran engendrados por la intervención de fuerzas divinas. En un ser vivo todo gira alrededor de la

reproducción. La perpetuación de la especie ha sido tema de grandes especulaciones y objeto de numerosos cultos (Pan, Juno, Caprotina, etc.).

En la antigüedad, una concepción generalizada era la teoría del doble semen. Hipócrates, Empédocles, Parménides, y Demócrito pensaban que la mujer suministraba un semen como el varón y que el sexo era determinado por la predominancia del semen del padre o de la madre. Además Demócrito e Hipócrates, sostenían que el semen provenía de todo el cuerpo.

Galeno y Aristóteles retomaron la concepción del doble semen, que fue nuevamente adoptada por Bacon (siglo XVI), Descartes (siglo XVII) en su *Tratado del Hombre*, y Diderot (siglo XVIII), quien en su *Interpretación de la Naturaleza*, escribía: "se ha descubierto que hay en un sexo el mismo fluido seminal que en el otro sexo".

Stenon, en 1667, lanzó la idea de que los testículos de las mujeres deben ser análogos a los ovarios y que estos testículos envían huevos al útero. Harvey (1651), en su *Tratado sobre la Generación*, no observa nada en los testículos hembra u ovarios y concluye que no tienen ninguna utilidad para la generación.

Von Graaf (1672) observó que los folículos contenían verdaderos óvulos en las diferentes especies de mamíferos y Leeuwenhoek (1674) describe los animálculos espermáticos. Dos teorías surgen, el ovismo, que pretende que el huevo engendrado por la hembra representaba a título exclusivo el elemento reproductor (el macho no intervenía sino por un vapor *aura seminalis* emitido por el esperma) y el espermatismo, que veía verdaderos embriones en los animálculos del semen.

Spallanzani (1768) demostró que el contacto del esperma y los óvulos era necesario para realizar la fecundación, pero concluyó que los espermatozoides no eran los agentes del desarrollo de los huevos. Sin embargo, Spallanzani (1780) realiza posteriormente con éxito la inseminación artificial de una perra, siendo los avances en el campo de la inseminación artificial de tal magnitud que podemos considerarlos como la primera biotecnología en la reproducción animal.

En el siglo XIX, comienzan las investigaciones positivistas. Von Baer (1827) descubre el óvulo en la perra; Kolliker (1841) establece el origen testicular del esperma; Barry (1840) observa la penetración de los espermatozoides



dentro de los óvulos; y Hertwig (1875) demuestra que la fecundación corresponde a la fusión de los núcleos del óvulo y del espermatozoide.

Al final del siglo XIX nace la endocrinología. Prenant (1898) afirma que el cuerpo lúteo es una glándula endocrina y, en 1900, Bouin y Ancei, demuestran que los testículos y los ovarios tienen igualmente una función endocrina.

Desde que Aristóteles indicara la relación entre las gónadas y el comportamiento, estudiando la influencia de la castración, hubo que esperar más de 2000 años hasta que Long y Evans (1922) describieran el ciclo sexual y Allen y Doisy (1923) identificaran la foliculina y la progesterona.

Por otra parte, Asheim y Zondek (1927) descubrieron que la orina de mujer gestante provocaba la ovulación y la formación de cuerpos lúteos, y Cole, Hart y Zondek (1930) demostraron que el suero de yegua gestante y la orina de mujer menopáusica eran capaces de estimular el desarrollo de los folículos ováricos, descubriéndose la hCG (gonadotrofina coriónica humana), la hMG (gonadotrofina menopáusica humana) y la PMSG o eCG (gonadotrofina de suero de yegua gestante o gonadotrofina coriónica equina)

Faltaba la observación directa en el hombre y en los animales de los acontecimientos de la reproducción y del desarrollo, pero poco a poco se aclararon los complejos mecanismos de la ovulación, fecundación e implantación, con los trabajos embriológicos de Debierre (1902), los de nidación en la especie humana, de Delporte (1912) o los de Hertig y Rock sobre la anatomía del embrión en sus primeras fases de desarrollo. La observación de los primeros contactos del embrión con el organismo materno representaron una nueva etapa, a la que siguió en la especie humana la fecundación in vitro, descrita por Shettles en 1960.

Desde que en 1866 Mantegazza, congeló espermatozoides humanos a  $-17^{\circ}\text{C}$  y posteriormente Luyet y Hodapp (1938) demostraron que los espermatozoides (de rana) podían ser congelados a  $-180^{\circ}\text{C}$ , se ha avanzado de forma espectacular en la criobiología espermática.

<b>Criobiología espermática en las diferentes especies (Malo, C.M., 2009)</b>	
<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>
Bovina	Amann y Almquist (1957)
Canina	Foote (1964)
Caprina	Fraser (1962)
Cunícola	Smith y Polge (1950)
Equina	Merkt y Krause (1966)
Felina	Platz y cols. (1978)
Humana	Freund y Wiederman (1963)
Ovina	Blackshaw y Emmers (1953)
Porcina	Pursel y Jonson (1975)

A principios del siglo XX, Heape realizó las primeras transferencias de embriones y desde entonces, se han llevado a cabo trasplantes desde el estadio de huevo, pasando por los de 2, 4, 8 ó 16 células, de mórula, o de blastocisto. La primera congelación de embriones de mamíferos se llevó a cabo en 1952 (Smith), pero no fue hasta 1974 (Whittingham et al.) cuando se obtuvo el primer nacimiento por trasplante de un embrión ovino congelado. La FIV se inicia en los mamíferos en 1953 por Thibault et al., aunque no se consiguió hasta 1985 el nacimiento de los primeros cabritos y hasta 1986 el de los primeros corderos.

De acuerdo con Martal (2002), si analizamos la evolución de los últimos años, se plantean interrogantes con respuestas divergentes o incluso opuestas por parte de: biólogos o tecnólogos, juristas o políticos, filósofos o teólogos, o simplemente por la sociedad civil.

La ciencia, los científicos o los biotecnólogos tienen o no razón al priorizar, en la especie humana, el utilitarismo por sus efectos beneficiosos inmediatos, no para todos pero sí para una mayoría, en nombre del bienestar, en detrimento de lo que algunos consideran (equivocadamente o no) como intangible, que es el respeto al embrión y a su no manipulación, lo cual irremediablemente atenta a la dignidad humana.

Mathieu (2000) dice que es posible defender una visión utilitarista del ser humano que justifica el sacrificio del embrión en interés de la colectividad, pero que debemos reconocer que esta elección es incompatible con el reconocimiento de cualquier dignidad al embrión humano. La regulación de las investigaciones sobre el embrión humano compromete a la sociedad en una de estas dos situaciones.

El principal problema que debemos abordar con serenidad es intentar armonizar una ética de convicción con una ética de responsabilidad, que permita la protección y seguridad del embrión y el beneficio del progreso de las investigaciones actuales, a veces conflictivas tanto desde el punto de vista ético como biológico, tales como: la epigénesis, la herencia extragenómica, la huella parental, el papel de las mitocondrias y las relaciones núcleo-citoplasmáticas, las células totipotentes, la transgénesis o la clonación, la transdiferenciación o el establecimiento de las relaciones feto-maternales, investigaciones legítimas pero no sabemos si útiles.

Diversos comentarios nos ponen en guardia frente a desvaríos o delirios que prolongan el alegato a favor de la heurística del miedo, en particular, como una advertencia legítima sobre el riesgo de la eugenesia. La realidad de esta reside menos en las consecuencias del progreso de la biología que en el intervencionismo del Estado en materia de la procreación humana. No olvidemos que las grandes corrientes eugenésicas del siglo XX tuvieron su origen no en la evolución de los conocimientos científicos sino en su interpretación falaz y, más aún, en consideraciones ideológicas y políticas asociadas. La eugenesia que puede aparecer en el siglo XXI es esencialmente económica; es decir países con estado de bienestar regulado por el Estado. Se puede temer que un intervencionismo en reproducción asistida, conduzca a un intervencionismo en la procreación natural (ejemplos geopolíticos demuestran la realidad de este riesgo).

La responsabilidad de la sociedad debe definir a dónde desea, o no desea ir. Debe promover la transparencia de sus investigaciones, desde sus inicios hasta sus más lejanas consecuencias. La mayoría rechaza la clonación reproductiva, no tanto en razón de una hipotética transgresión de la dignidad humana, sino por los riesgos médicos y por la temible libertad que supone en las relaciones inter-generacionales.

Se plantea si es legítima la investigación que lleva a la utilización terapéutica de células embrionarias, pero hace ya más de 40 años que los trabajos de Shettles y Edwards supusieron una transgresión, y nuestra sociedad los ha aceptado y reconocido.

En nombre del respeto a la dignidad del embrión humano, se debe prohibir el recurso terapéutico a las líneas celulares, cualquiera que sea su origen (embrionario, somático, por transferencia nuclear o transdiferenciada); se debe elegir entre el utilitarismo instrumental y el valor trascendente del

ser que será una persona, es decir, entre el bienestar esperado y la dignidad supuesta. Es una cuestión de conciencia y de referencia personal y no de respeto al Orden Público y a las buenas costumbres.

Unos prefieren no participar y rehusan, para ellos y sus familias los beneficios potenciales de estos hipotéticos progresos; otros, por el contrario, se orientan hacia el pragmatismo de que se trata de investigaciones sobre el embrión, destinadas a mejorar la Reproducción Asistida. Según esta postura, ¿es admisible sacrificar, en el marco de dichas investigaciones, embriones vivos obtenidos por Reproducción Asistida o por clonación, para prevenir, quizás mañana, muertes o malformaciones embrionarias?

## **II.- Reconocimiento Maternal de la Gestación en los animales domésticos:**

El principal objetivo que vamos a plantearnos es intentar descifrar ese “puzzle hormonal” que permite establecer la gestación a través del reconocimiento maternal de la presencia del embrión.

Revisiones generales se han realizado sobre el **Reconocimiento Maternal de la Gestación (R.M.G.)**, para dar visiones de conjunto (Basu, 1985; Thatcher et al., 1985; Heap et al., 1988; Flint et al., 1990; Bazer, 1992; Geisert et al., 1992; Espinosa, 1993 y 1994; Bazer et al., 1994; Roberts et al., 1996), o para analizar aspectos más específicos sobre el reconocimiento de la gestación, y entre ellas citaremos las de: Thatcher et al. (1984); Ford (1985); Sergeev et al. (1986); First and Eyestone (1988); Hansel and Hickey (1988); Flint et al. (1990); Roberts et al., 1990; Humbolt 1991; Parkinson (1992); Bazer (1992); Bazer et al. (1991), etc.

En primer lugar, deberíamos plantearnos por qué las hembras de los mamíferos desarrollan en su interior el proceso de la gestación, a través del cual el embrión, primero, y el feto, más tarde, van completando su formación y desarrollo hasta que pasan al medio exterior.

Para ello deberemos remontarnos a los 65 millones de años de la era Cenozoica en la que no solo evolucionaron la mayoría de las especies de mamíferos sino que se modelaron los rasgos de los continentes dando forma al mundo moderno. La desaparición de los grandes reptiles, en un periodo que se caracterizó por sus violentas y extensas glaciaciones, supuso la ascensión y evolución de los mamíferos, que adquirieron en la primera mitad del Cenozoico gran variedad, desarrollo y fuerza; para en su evolución posterior, presentar un menor tamaño corporal pero un mayor desarrollo cerebral en el que el encéfalo, con sus estructuras, se presenta como específico de los mamíferos.

La característica que diferencia a las más de 4.000 especies de mamíferos conocidas es ser vivíparos. La hembra pone huevos desprovistos de reservas nutritivas que, por tanto, deben desarrollarse en su interior, hasta que son depositados en el medio exterior. Así surgió la gestación como una particular forma de adaptación al medio, que garantizaba el desarrollo de la especie.

La evolución de los mamíferos es el resultado de una múltiple selección de hechos que favorecen a las especies que retienen los embriones en el interior de la madre, durante periodos que dependen de la duración de la gestación. La capacidad de retención embrionaria proporciona a los mamíferos ventajas frente a la predación y a los cambios extremos en el medio, en comparación con sus homólogos ovíparos.

Las especies vivíparas han desarrollado varios mecanismos: de control en el transporte de los huevos (oviposición inhibida); de intercambio de productos (gases, nutrientes y residuos); de relación entre la madre y el embrión-feto (placenta funcional); y de protección para el desarrollo del embrión frente a los mecanismos maternos de inmunorreconocimiento.

En la mayoría de las especies domésticas, el éxito del desarrollo embrionario se basa en la utilización del cuerpo lúteo como órgano endocrino, cuyo mantenimiento durante las primeras fases de la gestación está relacionado con el *Reconocimiento Maternal de la Gestación*. El establecimiento de la gestación implica un continuo diálogo entre el embrión y el medio materno, en el que la prolongación funcional del cuerpo lúteo es uno de los mayores acontecimientos. (Geisert, et al., 1992).

Los diferentes seres vivos, en su origen, son unicelulares. La vida, tanto en el hombre como en los animales, comienza en una célula indiferenciada. Las primeras divisiones de esa célula (ovocito fecundado) tienen como finalidad aumentar en número, por lo que cada generación celular es de menor tamaño que la precedente. Estas primeras células se denominan *totipotentes*, ya que cada una, aún indiferenciada, es capaz de proporcionar la información genética para desarrollar un animal completo. Aproximadamente, a la cuarta generación celular se produce la compactación y se inicia la especialización, con células que originarán el nuevo ser y células que formarán la placenta. Cuando se alcanza la fase de blastocisto, las células están claramente distribuidas y el embrión empieza a tener necesidades que no pueden ser satisfechas fuera del útero. El número de

células aumenta rápidamente y la masa total también, iniciándose una interacción entre la madre y el embrión mucho más compleja. (Dziuk, 1992). La madre suministra estimulantes y nutrientes esenciales, y las señales embrionarias hacen que se mantenga el suministro para la supervivencia y el desarrollo del embrión. (Godkin et al., 1984).

Aunque es evidente que la madre enseguida sabe que un embrión en estado de división está dentro de su tracto reproductivo, y reacciona a su presencia, sus precoces respuestas no parecen ser esenciales para la continuidad de la gestación. (O'Neill, 1992). El transplante de embriones a hembras no cubiertas puede lograrse satisfactoriamente en vacas, 2 semanas después de la concepción, siempre que la receptora esté adecuadamente sincronizada con la donante. Existe un momento, en todas las especies, en el que la presencia del *conceptus* es necesaria para mantener el útero en un continuo estado receptivo.

El concepto, produce un conjunto de productos (prostaglandinas, esteroides, metabolitos esteroides, proteínas, etc.) que al actuar junto a los componentes útero-ováricos mantienen la gestación (Martal, et al., 1984; Thatcher et al., 1984; Bazer et al., 1986; Gandolfi, et al., 1992).

El establecimiento de la gestación implica interacciones entre dos sistemas interdependientes definidos como el *conceptus* (embrión y sus membranas) y el útero. La naturaleza crítica del periodo de unión y la necesidad de sincronía entre el embrión y el útero, enfatiza la importancia entre el medio uterino y las señales del embrión, en el reconocimiento de la gestación. (Thatcher et al., 1984). La diferencia entre una vaca gestante y una vacía, es la presencia del embrión en el útero. Consecuentemente el mantenimiento del cuerpo lúteo, característico de gestación, es reflejo de la respuesta a las condiciones fisiológicas iniciadas por el concepto y sus productos en la luz uterina. El proceso en el que las señales de peri-unión del concepto se hacen presentes en la unidad maternal y originan el mantenimiento del cuerpo lúteo, se ha definido como "*Reconocimiento Maternal de la Gestación*".

El útero y el embrión son muy dinámicos, siendo necesaria una sincronía entre ambos, ya que la demanda embrionaria en cada momento es esencialmente cualitativa. (Harney et al., 1990). El éxito de una gestación dependerá de los acontecimientos que ocurran en la "interfase" embrión-madre.

El estudio de las secreciones uterinas en hembras cíclicas y gestantes (Ashworth, 1992), sugiere que la gestación o la presencia del embrión en el útero, modifica la bioquímica uterina en la oveja (Findlay et al., 1981); cerda (Geisert et al., 1982); vaca (Bartol et al., 1981); yegua (Zavy et al., 1979); etc.

Las interacciones entre el embrión y el útero, revelan que el blastocisto es capaz de modificar la secreción proteica endometrial desde la segunda semana de la gestación hasta la implantación. En los animales domésticos el intervalo entre la fecundación y la implantación varía de 16 días en la oveja a 36-40 días en la yegua (Hodgen and Itskowitz, 1988).

Son necesarias señales embrionarias y cambios hormonales para las transformaciones uterinas que conducen a la implantación. La naturaleza de las señales y como actúan es algo muy complejo, ya que algunas señales lo hacen durante poco tiempo, determinando respuestas uterinas locales características de la fase de aposición-implantación, mientras otras son efectivas a largo plazo, induciendo cambios sistémicos asociados a la gestación, tales como el mantenimiento del cuerpo lúteo o la respuesta inmune. Todo ello implica la necesidad de más de una señal embrionaria.

El establecimiento de la gestación será el resultado de las interrelaciones entre el embrión y sus membranas con el medio maternal (Basu and Kindahl, 1987; Martal and Chene, 1992).

### **II.1.- Mecanismos de R.M.G.**

Los embriones de todas las especies son capaces de sintetizar y segregar esteroides, prostaglandinas y polipéptidos durante el periodo de pre-implantación. El inicio de la señal que mantiene el cuerpo lúteo se produce cuando el trofoblasto contacta con los cuernos uterinos, siendo la expansión rápida del trofoblasto esencial para la liberación de la señal a través de los cuernos uterinos y para prevenir la luteolisis. El mantenimiento de la función luteal durante el inicio de la gestación en los rumiantes depende de la síntesis y de la secreción de polipéptidos por el embrión. (Bazer et al., 1991).

Diversos acontecimientos fisiológicos tienen lugar a lo largo de la gestación, siendo numerosos los cambios que entre el embrión y la madre se producen desde la fecundación hasta el momento de su implantación en el úte-



ro. Muchas cuestiones se plantean sobre el diálogo que se establece entre la madre y el embrión, siendo los intercambios entre ambos, numerosos y complejos. (Heap et al., 1989).

En los rumiantes, las proteínas trofoblásticas implicadas en la regulación de la luteolisis en el inicio de la gestación son interferones trofoblásticos. Estas trofoblastinas tienen acción antiviral, antiproliferativa e inmunosupresora, lo cual es típico de los interferones. El efecto antiproliferativo puede controlar el endometrio hasta que el trofoblasto expandido se sitúe en los cuernos uterinos, permitiendo que el embrión tenga el tiempo necesario hasta la implantación y pueda controlar la función endometrial.

El factor común asociado con la luteolisis en las especies domésticas, es la pérdida de receptores de progesterona en el epitelio uterino, hecho que implica que la responsabilidad para mantener el establecimiento de la gestación pasa de tener un control maternal a un control embrionario, y el sistema por el que el embrión establece el control, implica el mejor mecanismo para el desarrollo de la placenta y la unión fetoplacentaria.

En los ungulados, el cuerpo lúteo regresa como resultado de la liberación de la hormona luteolítica  $\text{PGF2}\alpha$  por el endometrio uterino en la parte final del ciclo estral. Si un ungulado queda gestante después de la cubrición, la señal luteolítica puede no producirse. La acción del concepto es prevenir la luteolisis, más por acción antiluteolítica que luteotrófica, desafortunadamente aunque el mecanismo luteolítico es común, las acciones antiluteolíticas utilizadas para mantener el cuerpo lúteo, difieren considerablemente entre los diferentes ungulados (Roberts et al., 1996).

## **II.2.- Productos implicados en el R.M.G.**

La naturaleza y función de las proteínas involucradas en el control de la gestación, son señales embrionarias necesarias para el R.M.G. Entre las señales de origen trofoblástico, están las gonadotropinas coriónicas descritas ya en 1927 por Ascheim y Zondek. Thatcher et al., (1985) habían determinado la importancia del mantenimiento del cuerpo lúteo en el R.M.G.

El desarrollo embrionario preimplantatorio se caracteriza por tres diferentes etapas morfológicas: compactación, cavitación y expansión blastocitaria, que requieren una muy bien orquestada expresión de los genes derivados del genoma maternal y embrionario.

Algunos genes y factores implicados en el reconocimiento maternal, son:

El **WT1**: que puede estar involucrado en la morfogénesis de la cresta urogenital y en la determinación sexual.

El **SFI (Steroidogenic Factor I)**, también denominado **FtzF1 (fushi tarazu factor 1)** o **Ad4BP (adrenal 4 binding protein)**, es un receptor nuclear que regula un gran número de genes implicados en la esteroidogénesis, y en el desarrollo de las gónadas y de las glándulas suprarrenales. Regula la transcripción del gen de la hormona antimulleriana, en combinación con: **SOX9, WT1 y DAX-I**.

El **SOX9**: intervendría en la transcripción de **AMH** y parece ser que tendría un papel central en la determinación del sexo, de forma comparable al **SRY**.

El **Gen DAX-I o Locus DSS (Dosage Sensitive Sex reversal)**, intervendría en el control de la función de reproducción, a nivel hipotálamo-hipofisario-gonadal y en el desarrollo de las crestas genitales. Aparentemente, **DAX-I** sería un antagonista del **SRY**.

El sexo genético en la fecundación depende de la naturaleza del cromosoma sexual X o Y, aportado por el espermatozoide fecundante. Si el cromosoma Y esta presente se forma un macho, por la acción de un gen de diferenciación (**SRY**) localizado en el cromosoma Y, que activa una cascada de otros genes y factores, para su acción.

**Oct-4** es una de las más precoces expresiones génicas conocidas, cuyo factor de transcripción parece ser que regularía el desarrollo de la embriogénesis, pudiendo ser un marcador precoz de la diferenciación de las células ES, e intervendría en una correcta preimplantación. (Gandolfi et al., 1997) y cuya localización queda reflejada en el cuadro siguiente.

**Localización de la proteína Oct-4 en diferentes estadios de maduración ovocitaria y embrionaria. (Gandolfi et al., 1997)**

Lugar	Ovocito		Zigoto	Células		Mórula	Blastocisto		
	Inmaduro	Maduro		4	8		Precoz	Normal	Expandido
Núcleo	++	+	++	++	++	+++	++	+	++
Citoplasma	+	+	+	+	+	+	+	+	+

En vacuno, en el desarrollo embrionario precoz, se han determinado las siguientes transcripciones de genes:

### Expresión de genes en embriones bovinos (Wrenzycki et al., 1997)

Gen	Ovocito		Zigoto	Células		Mórula	Blastocisto	
	Inmaduro	Maduro		2-4	8-16		Normal	Expandido
Dg 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Dc I	-	-	-	-	-	-	-	-
Hsp	+	+	+	+	+	+	+	+
Poly A	+	+	+	+	+	+	+	+
Glut - 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Plako	+	+	+	-	-	+	+	+
Cx 43	+	+	+	+	+	+	-	-
Dc II	-	-	-	+	+	+	+	+
Dc III	-	-	-	+	+	+	+	+
TP	-	-	-	-	-	-	+	+

- Desmocolina I, II, y III (Dc I, Dc II y Dc III)      Desmogleina 1 (Dg 1)
- Plakofilina (Plako)      Conexina 43 (Cx 43)
- Heat shock protein (Hsp 70,1)      Glucosa transporter (Glut - 1)
- proteína Trofoblastica (TP)      Poly A polimerasa (Poly A)

**Las Activinas**, pueden jugar un importante papel funcional en el desarrollo embrionario bovino, según Yoshioka et al (1997), quienes sugieren que los embriones bovinos pueden producir activina A de cigotos a mórula, y expresar receptores de activinas.

OVOCITO - EMBRIÓN	INHIBINA-ACTIVINA			FOLLISTATINA	RECEPTORES DE ACTIVINA				β-ACTINA
	α	βA	βB		I	IB	II	IIB	
Ovocito Inmaduro	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Ovocito Maduro	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Zigoto	-	+	-	+	+	-	+	+	+
2 Células	-	+	-	+	+	-	+	+	+
3 - 4 Células	-	+	-	+	+	-	+	+	+
5 - 8 Células	-	+	-	+	+	-	+	+	+
9 - 16 Células	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Mórula	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Blastocisto	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Blastocisto Expandido	+	+	-	+	+	-	+	+	+

Yoshioka, et al. (1997)

**Las Glicoproteínas oviductales específicas**, son segregadas por el epitelio del oviducto. La glicoproteína oviductal bovina (**boGP**), tiene un elevado peso molecular (97 kD). La boGP, aumenta el número de embriones que se desarrollan in vitro de mórula a blastocisto el día 6º después de la FIV. (Martus et al., 1997) y puede tener un papel importante en la regulación del desarrollo embrionario bovino.

En la secreción oviductal se han localizado además las siguientes moléculas: **bEGP** (bovine estrus-associated glycoprotein), **EGF** (epidermal growth factor), **TGF  $\alpha$**  (transforming growth factor), **EGF-R** (epidermal growth factor receptor), y subunidades  **$\beta A$  y  $\beta B$  de inhibina**. (Modina et al., 1997).

**E.P.F. (Early Pregnancy Factor)**, todos los embriones o de forma más general todos los productos de la concepción (embrión y anejos) son portadores de antígenos paternos y deberían ser rechazados por la madre. La forma en que estos antígenos se expresan y las modalidades de respuesta materna, condicionan el mantenimiento del embrión en el útero, al no ser un lugar desprovisto de actividad inmunitaria (Watson and Zancosky, 1990).

Desde 1970 hasta 1980, se efectuaron numerosos trabajos sobre el **EPF** (Early Pregnancy Factor). Este factor fue puesto en evidencia en la sangre materna, en las 24 horas post-fecundación, es el índice materno más precoz de gestación que se conoce (Heap et al., 1986), desapareciendo en caso de mortalidad embrionaria. El huevo emitiría una señal llamada zigotina, que estimularía la producción de EPF-A en el oviducto y de EPF-B en el ovario. La producción de EPF-B, estaría bajo la dependencia de la hipófisis. El EPF puede ser que participe en la tolerancia inmunológica de embrión por la madre (Martal and Charlier, 1985).

**P.A.F. (Platelet Activating Factor)**, Thibodeaux et al., (1994), indican que los embriones bovinos en estadios precoces producen un factor o factores, que pueden estimular la producción de progesterona por las células luteales varios días antes del momento aceptado como de reconocimiento materno de gestación. Este factor puede actuar directamente sobre las células luteales y estimular la producción de progesterona.

El aumento de la producción de progesterona por las células luteales, puede ser también por la acción del Factor de Activación de Plaquetas o **PAF** (Platelet Activating Factor), fosfolípido cuya acción luteotropa ha sido demostrada en otras especies. Este factor tiene características físico-químicas compatibles con las de los productos con actividad luteotropa. Además el PAF, es capaz de modificar la síntesis de PGE<sub>2</sub> por el endometrio, Gross et al (1990) encontraron que bajo la acción del PAF, se produce en hembras cíclicas un aumento el día 17 de PGE<sub>2</sub> y una disminución de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , indicando una ausencia de acción del PAF sobre la secreción de prostaglandinas en hembras gestantes, posiblemente por falta de sensibi-

lidad del endometrio en un momento en el que los factores anti-luteolíticos, han podido ya ejercer su acción. El PAF, es probablemente uno de los factores más precoces, de regulación de la síntesis de progesterona, pero no es seguro que sea un elemento esencial que permita el mantenimiento del cuerpo lúteo.

**Trofoblastinas e Interferones**, en los rumiantes, moléculas del trofoblasto, están implicadas en los mecanismos de reconocimiento. Las trofoblastinas son interferones que se comportan como señales embrionarias de gestación, siendo su acción crucial en la transformación del cuerpo lúteo de ciclo en cuerpo lúteo de gestación y en los mecanismos de no rechazo inmunológico del semi-injerto de origen paterno que constituye el embrión para la madre. Los IFN constituyen la señal responsable del reconocimiento maternal de la gestación, permitiendo el mantenimiento de la secreción de progesterona favorable al desarrollo embrionario (Martal et al., 1992).

Parece evidente que una insuficiente secreción de IFN, podría originar una mortalidad embrionaria, un aborto o una reabsorción en el comienzo de la gestación, debido entre otras, a su acción determinante en la supervivencia de las células multipotentes (Embrión Stem Cells) en el botón embrionario del blastocisto. Diversos argumentos demuestran que los IFN tienen un papel importante en el control de la tolerancia inmunológica del embrión en el momento de la implantación. Los embriones bovinos, según Roberts (1989), segregan un conjunto de proteínas, durante el periodo de reconocimiento, responsables de prevenir la regresión luteal al atenuar la acción de la luteolisina uterina; estas proteínas, relacionadas con los interferones, tienen potentes actividades antivirales y antiproliferativas.

Las trofoblastinas se producen en el momento crítico del establecimiento de la gestación y aunque su producción (días 15 a 25) cesa rápidamente, su efecto antiluteolítico puede persistir varios meses (Martal et al., 1991). Esta acción sobre el cuerpo lúteo es el resultado de complejas interacciones con otros parámetros tales como la ruptura de la estimulación de la oxitocina luteal, la relación entre los receptores de oxitocina y  $\text{PGF2}\alpha$  (Flint and Sheldrick, 1986; Flint et al., 1989), el balance entre las prostaglandinas luteolíticas ( $\text{PGF2}\alpha$ ) y luteotróficas ( $\text{PGE2}$  y  $\text{PGE1}$ ) (Curl, 1989), y las interacciones, intra-endometriales, intra-ováricas, e intra-luteales, con

los factores luteotróficos hipofisarios (PRL, LH) o placentarios (CG y PL) (Martal et al., 1987).

El **interferon tau (IFN $\tau$ )** es la señal antiluteolítica producida por el concepto de los rumiantes. Mecanismos potenciales de acción son: la estabilización o la regulación de los receptores endometriales de progesterona, incluyendo el bloqueo de progesterona y la prevención de la síntesis endometrial de receptores de estrógenos y de oxitocina; inhibición directa de los receptores de los estrógenos, atenuando la liberación pulsátil de PGF $2\alpha$ ; la inhibición directa de la síntesis de receptores endometriales de oxitocina; y la inhibición de los mecanismos post-receptores que previenen la inducción de la oxitocina sobre la liberación pulsátil de PGF $2\alpha$ .

Las señales de reconocimiento de gestación del trofoblasto de la vaca, son hormonas antiluteolíticas paracrinas, que actúan en el epitelio uterino inhibiendo la liberación de la prostaglandina luteolítica (PGF $2\alpha$ ). Las señales antiluteolíticas, no se sabe que actúen directamente sobre el cuerpo lúteo; sin embargo, las señales de protección luteal tales como la PGE $2$ , pueden contrarrestar potencialmente los efectos luteolíticos de la PGF $2\alpha$ . La señal antiluteolítica es el interferon tau (IFN $\tau$ ) producido por el trofoectodermo del concepto de la vaca.

Son otros muchos los trabajos realizados respecto a trofoblastinas e interferones en ganado vacuno en relación con el RMG, de entre ellos citaremos los de: Knickerboker et al. (1986), Roberts et al. (1991) y Wiltbank et al. (1992), sobre la acción de la bTP en la inhibición de PGF $2\alpha$  y en el mantenimiento del cuerpo lúteo; Anthony et al. (1988), Roberts et al. (1990), Farin et al. (1990), y Hansen (1991) sobre bTP y reconocimiento maternal; Short et al. (1991) sobre homologías entre la bTP-1 y el bIFN $\tau$ ; Francis et al. (1991), Bazer and Johnson (1991), Flint et al. (1991), Parkinson et al. (1992), Rajnchappel (1992), Stewart et al. (1992), etc., sobre la acción de los IFN (bIFN $\alpha$ , rboIFN $\alpha_1$ , rboIFN, etc.) en el mantenimiento del cuerpo lúteo, acción antiluteolítica y reconocimiento maternal de la gestación.

### **PAG (Pregnancy Associated Glycoprotein).**

El embrión, antes de la implantación, produce varias señales (identificadas) susceptibles de modificar la actividad inmunitaria materna. Entre estas señales, encontramos en la vaca, la PGE $2$  y la proteína antiluteolítica (trofoblastina) bovina. Un poco más tarde (días 17-18 de gestación) y antes de

la implantación, se ha demostrado que las proteínas embrionarias son capaces de disminuir la actividad linfocitaria en la vaca (Fisher et al., 1985). Dunbar et al. (1990) indicaron que la PSPB podía ejercer este tipo de actividad al principio de gestación. Esta proteína identificada en bóvidos, ha sido aislada en embriones de 25 a 45 días (Butler et al., 1982). La PSPB parece particularmente interesante para efectuar diagnósticos de gestación en ruminantes; ya que contrariamente a las señales locales descritas anteriormente, su dosificación es posible en la circulación periférica, permitiendo diagnósticos de gestación y de mortalidad embrionaria.

Estudios inmunocitquímicos han demostrado que la PAG-1 en el ganado vacuno se localiza en los gránulos dentro de las células binucleadas, en la capa externa de la placenta (Zoli et al., 1992). Estas células comienzan a aparecer justo antes que la preplacenta (trofoblasto) se una con la capa uterina (alrededor del día 17, en el ganado vacuno) y constituya los componentes invasivos de la placenta. Después se fusiona con las células epiteliales uterinas y los densos gránulos secretorios descargan su contenido en la cara basolateral del epitelio uterino (Wooding, 1992). La PAG-1 mRNA, se expresa abundantemente desde las primeras células binucleadas, justo antes de la implantación, hasta el final de la gestación, aproximadamente a los 280 días en la vaca. Esta expresión difiere notablemente de otro producto específico del trofoblasto, el IFN $\gamma$  que se localiza en las células mononucleares del trofoectodermo y se expresa durante unos pocos días, antes de iniciarse la implantación.

La PAG, está ampliamente distribuida, habiendo sido descubierta en mamíferos Artiodactilos y Perisodáctilos, de hace al menos 55 millones de años, lo cual indica no sólo una importante curiosidad, sino la importante función que puede desempeñar en la gestación.

Los **lactógenos placentarios (PL)** han sido identificados en numerosas especies (primates, ruminantes y roedores) pero no se han encontrado en équidos, suidos, carnívoros (perra y gata) y lagomorfos (coneja). Tienen actividad mamotrófica, lactogénica y somatotrófica los siguientes: hPL (humana), rhPL (rhesus), oPL (I y II) (oveja), cCS (cabra), bPL (vaca), y el PL del cobaya; presentando solo actividad mamotrófica y lactogénica, los: PL del ciervo, rPL (I y II) (rata), mPL (I y II) (ratón) y ha PL (I y II) del hamster. Los PL están relacionados estructuralmente con las hormonas PRL y GH, participando en el metabolismo intermediario maternal y fetal, y tenemos que tener en cuenta que todas estas hormonas forman una gran

familia de PRL, con un origen genético ancestral común, que tuvo lugar en una segregación cromosómica hace 400 millones de años. Posteriormente hace unos 20 millones de años se recombinaron intra-cromosómicamente las hormonas del crecimiento y los lactógenos placentarios.

### **Principales productos implicados en el R.M.G.**

- TGF-alfa: Transforming Growth Factor alfa
- PSP60: Pregnancy Specific Protein 60
- TGF $\beta$ 1: Transforming Growth Factor  $\beta$ 1
- SP1: Schwangerschafts Protein B
- IFN: Interferon
- PSP: Pregnancy Specific Protein
- EGF: Epidermal Growth Factor
- PL: Placental Lactogens
- PAF: Platelet Activating Factor
- CS: Chorionic Somatomamotropins
- EPAF: Embryo Derived Platelet Activating Factor
- PP12: Placental Protein 12
- EPF: Early Pregnancy Factor
- PP14 : Placental Protein 14
- CG: Chorionic Gonadotropin
- AFP: Alfafetoproteína
- IGF: Insuline like Growth Factor (I y II)
- PRL: Prolactina
- KSGF: Kaposi's sarcoma type growth factor A
- PSPB: Pregnancy Specific Protein B

### **II.3.- Desarrollo embrionario**

Después de la fecundación, se inicia la segmentación del huevo, alcanzando hacia el día 5, en los rumiantes, el estadio de blastocisto. A partir del estadio de 16-32 células, se establecen las relaciones entre los blastómeros, adquiriendo el estadio de mórula a las 32 células, empezando a continuación a acumularse líquido en el interior e iniciándose la formación del blastocisto. La eclosión se lleva a cabo cuando el embrión tiene unas 200 células (días 8-9, en la oveja), iniciando su elongación alrededor de las 1.000 células. Una importante diferenciación celular tiene lugar, principalmente, en la masa celular intensiva (interna y externa) y en el trofoblasto (que formará la placenta).



En la oveja y cabra, en el estadio de 4 células, cada una es capaz al ser introducida en una membrana pelúcida vacía, de formar un blastocisto y después, por transferencia, producir un recién nacido viable. En cambio, en el estadio de 8 células, los resultados favorables son excepcionales debido a que sólo la totipotencia absoluta puede ser funcional y sólo algunos blastómeros conservarían su capacidad totipotente.

Cientos de proteínas son sintetizadas por el citoplasma del huevo, aunque solo unas pocas han sido identificadas. Las proteínas HSP68 y HSP70, serían expresadas desde la activación del genoma embrionario.

La compactación de los blastómeros, que se caracteriza por su diferenciación, tiene lugar en el estadio de 32-64 células en la oveja, realizándose por acción de la ovumorulina que es una CAM (Cell Adhesion Molecule). La comunicación entre los blastómeros es muy importante para su desarrollo y posterior formación del blastocele. Numerosos factores de crecimiento se han puesto en evidencia, en la oveja se ha comprobado la presencia de TGFb1, TGFb2, y los IGF1 e IGFII, tanto en el oviducto como en el endometrio.

### **Cronología del desarrollo embrionario en los pequeños rumiantes**

	Día	Número de células
<b>Zigoto</b>	1	1
<b>Huevo segmentado</b>	2	2-4
<b>Activación genoma embrionario</b>	3	8
<b>Morula</b>	4	16
<b>Compactación</b>	4	32
<b>Blastocisto: Compactación</b>	5	64
<b>Blastocisto: Desarrollado</b>	6-7	128
<b>Eclosión (Salida zona pelucida)</b>	8-9	Más de 200
<b>Implantación</b>	15	

### **Expresión de factores de crecimiento en el periodo preimplantatorio en la oveja**

	Embrión G14-20	Trofoblasto G18-30	Oviducto G5-20	Endometrio G5-20
<b>TGFβ1</b>	++	++	++	++
<b>TGFβ2</b>	+	+	+	+
<b>IGF1</b>	+	+	+	+
<b>IGFII</b>	++	++	++	++
<b>R-EGF</b>	+	+		

++: Analizado por Northern bolt

+: Analizado por RT-PCR

(Chene et al., 1991)

#### II.4.- Reconocimiento precoz de la gestación

A las pocas horas después de la fecundación, el huevo de ratona libera un factor (EPAF) que origina un descenso transitorio en el número de plaquetas maternas (O'Neil, 1985). El factor (PAF) aislado de huevos de ratón y humanos (Collier et al., 1988), es un mediador químico producido por neutrófilos, músculo liso, hígado y otros tejidos, que además de su acción en la activación plaquetaria, es un importante mensajero intracelular y un potente activador de variedad de células y tejidos (Hanahan, 1986). Los PAF embrionarios intervienen en el mantenimiento de la función luteal (Battista et al.1989), estimulan la síntesis de progesterona (Hansel et al., 1989) y alteran la fisiología maternal, facilitando el establecimiento de la gestación por acciones inmunosupresoras (O'Neill et al., 1989).

Además de las funciones autocrinas en el desarrollo embrionario, en el ratón (Orozco et al., 1986) y en el conejo (Sueoka et al., 1988b), el PAF representa el "factor del huevo" necesario para inducir la producción de EPF.

En cambio en la yegua sólo los embriones son transportados al útero a los 5 días de la fecundación, mientras que los ovocitos no fecundados son retenidos en el oviducto durante meses (Betteridge and Mitchell, 1974). El elevado nivel de PGE<sub>2</sub> segregada por embriones de 5 y 6 días, es la señal que inicia el transporte oviductal; aunque no sólo la PGE<sub>2</sub> embrionaria participa, ya que la administración parenteral de PGE<sub>2</sub> también acelera el transporte oviductal de los embriones equinos (Weber et al., 1991).

El desarrollo de los embriones está relacionado con la presencia muy precoz (embriones de ratón) de transcritores de mRNA para: TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1; IGF II; EPAF-A y KSGF-A (Weber et al., 1991). Se piensa que varios factores de crecimiento pueden ser inductores del desarrollo embrionario tanto de anfibios como de mamíferos. Se sabe que el TGF $\alpha$ , el TGF $\beta$  y el EGF intervienen en el desarrollo embrionario del ratón (Paria and Dey, 1990); el IGF-I y la insulina, promueven divisiones, aumentan la compactación y la formación de blastocistos y estimulan la síntesis de proteínas en la masa celular interna y en las células del trofoectodermo (Gardner and Kaye, 1991; Harvey and Kaye, 1991a).

Un papel específico del oviducto en el desarrollo embrionario precoz es el hecho de que las células epiteliales del mismo participan en la viabilidad de los embriones, posiblemente facilitando la iniciación de la transcrip-

ción embrionaria (Crosby et al., 1988). Inicialmente descrita en la oveja, la observación se ha confirmado en todas las especies y se piensa que las secreciones específicas originadas en el epitelio, pasan la barrera del oviducto y son también responsables de efectos eutróficos.

Varias proteínas y proteínas específicas del oviducto parecen estar involucradas. En el hámster, la oviductina, proteína glicosilada producida en el epitelio, se liga a la zona pelúcida de los huevos (Kan et al., 1989). En el ratón, una glicoproteína de elevado peso molecular, la GP215 es secuestrada selectivamente en el espacio perivitelino y se mantiene concentrada hasta que la zona pelúcida se rompe (Kapur and Johnson, 1988). En el babuino (Boice et al., 1990) y en la oveja (Gandolfi et al., 1991), la interacción embrión-oviducto es incluso mayor, los antígenos oviductales no se observan sólo en la zona pelúcida y en el espacio perivitelino sino que se asocian también con la membrana vitelina y con el citoplasma embrionario.

Rápidamente, después de la fecundación (6-24 horas), aparece el factor precoz de gestación (EPF) como respuesta maternal precoz y específica de la gestación. Además de disminuir la actividad de los linfocitos, la función del EPF podría ser la regulación del sistema inmune maternal, representando la más precoz interacción entre el huevo, el oviducto y el ovario, estando activada esta función incluso antes de comenzar la transcripción embrionaria.

Las moléculas del trofoblasto denominadas trofoblastinas, se comportan como señales embrionarias de gestación, siendo su acción crucial en el mantenimiento del cuerpo lúteo y en los mecanismos de no rechazo inmunológico del semi-injerto de origen paterno que constituye el embrión para la madre. Estas proteínas trofoblásticas pueden ser producidas tanto por embriones completos como por fragmentos o por vesículas trofoblásticas, tienen un papel crucial en las primeras etapas de tolerancia inmunológica del embrión por la madre.

La transformación del cuerpo lúteo sería de la siguiente forma: la trofoblastina, actuaría directamente sobre el endometrio provocando la aparición de un inhibidor de la síntesis de prostaglandina e inhibiendo la acción de la oxitocina luteal. La presencia del embrión, provoca además una inhibición del desarrollo folicular y una disminución del estradiol, y origina un descenso de receptores de oxitocina.

La secreción de trofoblastina, vuelve a presentarse nuevamente entre los días 25 y 40 de gestación, siendo en este caso su presencia necesaria para mantener el cuerpo lúteo hasta que la placenta pueda producir suficiente progesterona para garantizar la gestación.

La implantación implica una sincronización precisa entre el estado de desarrollo del blastocisto y la receptividad uterina. Los dos constituyentes celulares (trofoblasto y masa celular interna) son imprescindibles para el desarrollo del embrión. El trofoblasto es responsable de la implantación, siendo la masa celular interna origen de las capas embrionarias, cuya interacción, asociación y desarrollo conduce a la diferenciación de tejidos, órganos y anejos embrionarios.

En los rumiantes, justo antes de la implantación, el blastocisto pierde la zona pelúcida. El estado en que se implanta el blastocisto sobre el endometrio, es muy variable de una especie a otra. La implantación sería el resultado del ajuste entre la diferenciación celular del trofoblasto y el endometrio, bajo acción esteroide ovarica. Se necesita una sincronización entre el desarrollo del embrión y la maduración del endometrio. Las modificaciones que suscitan la activación y la fijación de los blastocistos, resultan de una modulación esteroide ovárica y de la expresión de las células endometriales. Los estrógenos actuarían principalmente a nivel del epitelio endometrial, estableciendo el primer contacto con el trofoectodermo embrionario y las proteínas uterinas intervendrían en la decidualización e implantación.

Se sabe que los factores TGF y EGF, intervienen en el desarrollo embrionario, y el IGF-I y la insulina, promueven divisiones, aumentan la compactación y la formación de blastocistos y estimulan la síntesis de proteínas. Además las células del endometrio tienen un elevado número de receptores de factores de crecimiento de origen embrionario, que pueden participar también en la decidualización y en otros aspectos de la implantación.

## **II.5.- Relaciones embrionario-uterinas**

La madre, antes de ser consciente de que está gestante, se comunica con el embrión estableciendo un “diálogo madre-embrión” a través de numerosos mensajes bioquímicos (Espinosa, 1994). Wilson et al., (1992). El embrión bovino entra en el útero entre los días 4 y 5 post-estro, rompe y sale

de la zona pelúcida entre los días 8 y 9, y comienza a alargarse aproximadamente el día 13, debiendo encontrarse en el útero el día 16-17 para que el reconocimiento maternal tenga lugar y no se presente un nuevo estro.

El embrión, después de salir de la zona pelúcida, segrega numerosas señales proteicas. La mayoría de los factores embrionarios, encontrados en la circulación maternal son producidos por las células binucleadas del trofoblasto. La luteolisis sería prevenida por proteínas tipo interferón, producidas unos pocos días antes de la implantación, actuando vía endometrial y no encontrándose en la circulación maternal.

Diversos argumentos demuestran que los interferones tienen un papel importante en el control de la tolerancia inmunológica del embrión en el momento de la implantación (Fillion et al., 1990; Martal et al., 1991).

La **trofoblastina ovina** o interferón trofoblástico ovino (oTP), es la señal proteica ovina que se emite del día 12 al 22 en la oveja. Tiene un papel crucial en las primeras etapas de la tolerancia inmunológica del embrión por la madre. La oTP es una holoproteína antiluteolítica, segregada por el trofoblasto ovino, con un máximo el día 14 de gestación y descendiendo a partir del día 16. La anulación de secreción se observa en las regiones del trofoblasto que han establecido contacto celular con el epitelio uterino (el proceso de implantación comienza en la oveja el día 15). En la oveja Moor and Rowson (1966), demostraron que el conjunto del embrión y las envolturas, inhibía la actividad luteolítica cíclica por un mecanismo antiluteolítico local y no a través de la circulación general, como hace la hCG. La oTP natural es capaz por vía intra-uterina de retrasar en ovejas cíclicas la regresión del cuerpo lúteo, reduciendo el principal metabolito de la PGF2-alfa.

La **trofoblastina bovina** o interferon trofoblástico bovino (bTP), permite mantener el cuerpo lúteo tanto ovino como bovino, lo mismo que la oTP. Está igualmente implicada en mecanismos de tolerancia inmunológica de la madre en el momento de la implantación. La bTP es una proteína glicosilada no específica, ya que la oTP también tiene actividad (antiviral) en células bovinas. La bTP tiene un efecto comparable a la oTP, retrasando la regresión luteal en la vaca, aunque solo es sintetizada durante unos pocos días (15 al 25).

La **trofoblastina de coneja** también ha sido determinada (Zouari et al., 1991b), curiosamente su actividad IFN antiviral es segregada tanto por el

endometrio de conejas gestantes como pseudogestantes, siendo su estructura como la de la oTP. Se segrega durante un periodo muy breve (días 6-7) y coincidiendo con el comienzo de la implantación (día 7). A diferencia de los interferones anteriores, este IFN o TP-like, no se identifica sino excepcionalmente en los embriones de coneja. La actividad antiviral se ha demostrado en las células endometriales de conejo durante la implantación (Zouari et al., 1991 a).

La **trofoblastina porcina** tiene también actividad antiviral, siendo segregada por el trofoblasto de cerdo. Se sitúa su máxima secreción los días 14-16, disminuyendo hasta hacerse indetectable a partir del día 20. Su naturaleza difiere de la oTP, siendo la trofoblastina porcina igual al interferón linfocitario porcino (IFN de tipo II); aunque otro interferón trofoblástico porcino (IFN $\gamma$ ) se segrega, perteneciendo a una subfamilia de los IFN de tipo I. Para Meulen et al. (1988) se segrega una primera señal el día 11 que prolonga la fase luteal 4 días si hay blastocistos de 8 mm; siendo necesaria una segunda señal para mantener el cuerpo lúteo toda la gestación. Las trofoblastinas porcinas no parecen estar implicadas en el control de la función luteal, interviniendo posiblemente en la tolerancia inmunológica y en la morfogénesis de los embriones porcinos (La Bonnardiere and Martal, 1991), presentando actividad antiviral el embrión porcino (Godkin et al., 1987). Los embriones porcinos segregan también durante este periodo proteínas (Godkin et al., 1982), que no tienen acción antiluteolítica (Harvey and Bazer, 1989), pero que tienen un importante papel en la remodelación del útero para la preparación de la gestación (Harvey and Bazer, 1990).

La señal antiluteolítica en la cerda, son los estrógenos segregados por el embrión los días 11-13, considerándose que la prevención de la regresión luteal se hace reconduciendo la PGF2 $\alpha$  de la vascularización útero-ovárica hacia la luz uterina (Bazer, 1989; Bazer et al., 1989). Para asegurar con éxito una gestación, es esencial que el embrión produzca y segregue cantidades apropiadas y en el momento adecuado (Wilson et al., 1992). Un avance uterino prematuro tiene efectos embriotóxicos, asociados con alteraciones en la síntesis endometrial uterina (Gries et al., 1989) y pérdidas de glicocalix epitelial (Blair et al., 1991) durante el periodo de unión embrionaria.

La **trofoblastina equina**, TP-like o IFN equino, tiene una actividad inmunológica similar a la oTP (Zouari et al., 1991a), pero se segrega débilmente

(100 veces menos que el IFN porcino y 10.000 veces menos que el IFN ovino, bovino y caprino). Se localiza sólo los días 14 a 18, periodo que no corresponde al momento de la implantación (día 34) sino al de la organogénesis del botón embrionario (se observan células multipotentes el día 15 y el corazón late el día 17).

No sólo es la relación entre el embrión y el útero, lo que conduce al establecimiento de la gestación, sino también la relación entre embriones que ocupan el mismo útero. Por transferencia de embriones, se demuestra que hay factores competitivos entre embriones de diferentes estados de desarrollo, transfiriendo embriones de dos edades (4 y 8 días) en ovejas, sobreviven principalmente los de más edad, lo que puede ser debido a que los embriones mayores segregan oTP-1 antes y estimulan cambios uterinos que pueden ser perjudiciales para los más jóvenes. (Wilnut et al., 1988). Hechos similares ocurren en la cerda, pero el mecanismo será a través del estradiol segregado por los embriones de mayor edad, que podría ser tóxico para el desarrollo de los más jóvenes.

Las trofoblastinas se producen en el momento crítico del establecimiento de la gestación, su producción cesa rápidamente pero el efecto antiluteolítico puede persistir varios meses (Martal et al., 1991), esta acción sobre el cuerpo lúteo es el resultado de complejas interacciones con otros parámetros tales como: la ruptura de la estimulación de la oxitocina luteal y la relación entre los receptores de oxitocina y FGF2 $\alpha$  (Flint et al., 1989); el balance entre las prostaglandinas luteolíticas (PGF2 $\alpha$ ) y luteotróficas (PGE2; PGE1); las interacciones intra-endometriales, intra-ováricas e intra-luteales con los factores luteotróficos hipofisarios (PRL, LH) o placentarios (CG y PL) (Martal et al., 1987).

## **II.6.- Cuerpo lúteo de ciclo y de gestación**

En los mamíferos, la ovariectomía al comienzo de la gestación provoca aborto. En la mayoría, la vida del cuerpo lúteo es breve y su regresión permite un nuevo ciclo ovulatorio. La gestación induce el bloqueo de la luteolisis y la transformación del cuerpo lúteo de ciclo en cuerpo lúteo de gestación. Posteriormente, la placenta puede tomar el relevo en la producción de progesterona.

La transformación morfológica y funcional de las células de la teca interna y de la granulosa del folículo ovulatorio, origina el cuerpo lúteo. En la mayoría de las especies los dos tipos de células se mezclan formando un te-

jido de aspecto histológico más o menos homogéneo; las células grandes provienen de la granulosa y las pequeñas de la teca interna, siendo cada categoría portadora de determinados antígenos de superficie, distintos según su origen. En el curso de la gestación, algunas células pequeñas se transformarán en células grandes y se difuminan los determinantes antigénicos de superficie (Niswender 1990). La formación progresiva del cuerpo lúteo funcional los días post-ovulación implica importantes acontecimientos morfológicos; después de un periodo de latencia (de 1-2 días en los rumiantes) se mantiene funcional durante 12 a 21 días según las especies, pero constante en más-menos 1 día, en cada especie.

La luteolisis no es debida a modificaciones sanguíneas de LH o de PRL. En todas las especies la acción luteolítica tiene su punto de partida en el útero y precisamente en el endometrio, siendo el factor luteolítico la  $PGF2\alpha$ . Los cuerpos lúteos de la vaca y de la oveja, contienen grandes cantidades de oxitocina, sintetizada y almacenada en las células luteales grandes, donde asociada a la neurofisisina se encuentra en los gránulos de secreción celular. En la oveja se ha demostrado que es la elevación de  $PGF2\alpha$ , la que precede (15 minutos) a la de oxitocina, lo que sitúa el elemento desencadenante a nivel del útero. Si la fase luteal se prolonga, por ejemplo por gestación, el cuerpo lúteo no contiene más oxitocina y pierde la posibilidad de sintetizarla.

La transformación del cuerpo lúteo de ciclo en cuerpo lúteo de gestación, supone la inhibición de la luteolisis y el mantenimiento de los estímulos hormonales luteotropos.

Aunque la importancia en el R.M.G. sea el diálogo entre el concepto y el endometrio, es necesario recordar que el sistema endocrino maternal actúa coordinando el desarrollo de la gestación (Thatcher et al., 1997). La diferenciación y el desarrollo del cuerpo lúteo es esencial para la sincronización del desarrollo embrionario y uterino (Thatcher et al., 1994) y una suficiente secreción de progesterona se considera que es crítica en el mantenimiento de un medio antiluteolítico (Mann and Lamming, 1995). El desarrollo de folículos ováricos elimina el cuerpo lúteo del ovario o lo atenúa si es el ipsilateral al concepto en el inicio de la gestación.

Aunque la progresión de un cigoto desde una célula hasta un blastocisto multicelular, y el desarrollo de la masa celular interna en feto, son procesos en los que se pueden hacer comparaciones entre las especies, los



caminos para formar una placenta madura son desconcertantemente diversos. Esta variabilidad en la estructura placentaria ha sido siempre una fuente de confusión en la evolución biológica. ¿Por qué un órgano aparentemente no expuesto a la presión externa y tan esencial para el éxito reproductivo, presenta tal diversidad? Parece como si la evolución de la placenta de los mamíferos haya sido el resultado de importantes conflictos genéticos entre la madre y el desarrollo de la camada.

La implantación del embrión en la pared uterina es un perfeccionamiento lógico de la viviparidad (Amoroso 1991). La implantación implica una sincronización precisa entre el estado de desarrollo del blastocisto y la receptividad uterina al comienzo del proceso. El útero, receptáculo normal de la gestación, es paradójicamente el único órgano capaz de impedir la implantación.

Las señales del trofoblasto deben preparar el epitelio uterino para poder acceder a la circulación maternal. La estructura de la placenta no solo tiene impacto en el intercambio de nutrientes sino también es el medio por el que la madre y el concepto, intercambian información (Pérez y Pérez y Pérez Gutiérrez, 1993)

Son muchos los factores que intervienen en la interacción entre el embrión y el útero y el ovario, (Thatcher et al., 1989), para el mantenimiento de la gestación. A partir del momento en que el embrión sale de la zona pelúcida, hacia el 9º día de la gestación, se habla del producto de la concepción o "*conceptus*", término que considera el conjunto del botón embrionario y el trofoblasto. Las células del botón embrionario darán origen primero al embrión y, posteriormente, al feto. El trofoblasto, que se diferencia hacia el 5º-6º día después de la fecundación, es un tejido con muy rápido crecimiento, constituido por el endodermo y el trofoectodermo; forma el corion y es el origen de los cotiledones.

El papel del trofoblasto durante la gestación es fundamental para asegurar el crecimiento fetal pero, ante todo, su funcionamiento es crítico para asegurar un correcto desarrollo de las primeras etapas del desarrollo embrionario. El trofoblasto asegura muy precozmente la síntesis de enzimas, de activadores e inhibidores enzimáticos, de esteroides y de prostaglandinas. Se sabe, hoy día, que el mantenimiento del cuerpo lúteo y la secreción de algunas moléculas inmunosupresoras, procesos indispensables

para la supervivencia del embrión en el organismo materno, están bajo control trofoblástico

Las prostaglandinas embrionarias parecen estar implicadas en la migración de los embriones, en la salida de los blastocistos de la zona pelúcida, en el transporte de iones a través del trofoectodermo, en la acumulación de líquido en el blastocele, en el aumento de permeabilidad capilar endometrial y en el metabolismo de la glucosa en el blastocisto. (Lewis, 1989).

El control de la luteolisis en la cerda difiere de los rumiantes, ya que el cuerpo lúteo es refractario a la  $PGF2\alpha$  hasta el día 11 del ciclo. En la cerda no existe la misma relación cuerpo lúteo-cuerno ipsilateral, que en otras especies, ya que puede existir una vía sistémica de actuación de la  $PGF2\alpha$ , debido a un reducido metabolismo pulmonar. La eliminación del cuerpo lúteo el día 12, corresponde al periodo de liberación endometrial de  $PGF2\alpha$  después de 10 días de estimulación de progesterona y pérdida de los receptores de progesterona de la superficie endometrial y del epitelio glandular (Geisert et al., 1992).

En la yegua los mecanismos de luteolisis son distintos, al no existir un sistema veno-arterial ovárico que permita una eficiente transferencia de la  $PGF2\alpha$ , la cual parece estar regulada por los niveles de progesterona, no estando clara la acción de estrógenos y oxitocina en la estimulación de la  $PGF2\alpha$  (Goff et al., 1991). El factor embrionario inhibidor necesita de la movilidad del embrión para bloquear la  $PGF2\alpha$  en el útero de la yegua (Sharp et al, 1989). Una movilidad embrionaria restringida permite la luteolisis, con el subsiguiente descenso de progesterona y conduce a la mortalidad embrionaria; mientras que una movilidad normal del embrión equino permite la comunicación con la mayor parte del endometrio, lo cual es necesario para el mantenimiento del cuerpo lúteo y la supervivencia del embrión (Mc Dowell et al., 1988).

### **Cuerpo lúteo y embrión.**

En los **rumiantes**, el paso de cuerpo lúteo de ciclo a cuerpo lúteo de gestación, está asegurado por el embrión, que bloquea la acción luteolítica del útero, y por la acción luteotropa de las hormonas hipofisarias, con una contribución progresiva más o menos importante de la placenta.

El efecto antiluteolítico persiste mucho tiempo después de haber sido desencadenado por la presencia del embrión en el útero.

El esquema del paso de cuerpo lúteo de ciclo a cuerpo lúteo de gestación en los rumiantes sería: la trofoblastina segregada (días 11 a 21 en la oveja y días 15 a 25 en la vaca) actúa directamente en el endometrio en el que provoca la aparición de un inhibidor de la fosfolipasa en la oveja o de un inhibidor de la prostaglandin sintetasa en la vaca, inhibiendo la acción de la oxitocina. Como consecuencia se produce una disminución en el número y amplitud de las descargas de  $\text{PGF2}\alpha$  y oxitocina al comienzo de la gestación.

En la **cerda**, la luteolisis se produce normalmente el día 15-16 del ciclo. El embrión reorienta la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  hacia la cavidad uterina (secreción exocrina) en detrimento de la secreción hacia la vena útero-ovárica (secreción endocrina), lo cual se atribuye al estradiol segregado por el embrión a partir del día 10-12, ya que la inyección intra uterina de estradiol a partir de esos días provoca la inversión del sentido de secreción de la  $\text{PGF2}\alpha$ . (Geisert et al., 1990).

En los **carnívoros**, el cuerpo lúteo de ciclo puede alcanzar y sobrepasar la duración de la gestación. La presencia del embrión en el útero no modifica significativamente la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, siendo controlada la actividad luteal por la hipófisis materna a través de la LH y de la PRL.

En la **coneja**, el estradiol es luteotrófico; las células luteales tienen receptores de estradiol, el cual provoca crecimiento del cuerpo lúteo y secreción de progesterona, incluso en ausencia de LH. En la coneja gestante o pseudogestante, hipofisectomizada, se puede restablecer el nivel de progesterona administrando estradiol, que induce la síntesis de pregnenolona y progesterona a partir del colesterol. El estradiol actúa en sinergia con la prolactina durante la primera mitad de la gestación y con el lactógeno placentario durante la segunda mitad.

En los **animales con nidación diferida (diapausa embrionaria)**, el medio exterior es determinante para el establecimiento de la gestación. La implantación coincide con una reanudación de la actividad luteal y podría deberse a sustancias no esteroideas de origen luteal. (Flint et al., 1990).

Como hemos visto, los embriones de todas las especies domésticas son capaces de sintetizar y segregar: hormonas esteroideas, prostaglandinas y polipéptidos durante el periodo de preimplantación. Excepto en el conjunto embrionario equino, que migra en los cuernos uterinos, en las

demás especies, el inicio de la señal que mantiene el cuerpo lúteo, se produce cuando el trofoblasto contacta con los cuernos uterinos, siendo la expansión rápida del trofoblasto, esencial para la liberación de la señal a través de los cuernos uterinos, y para prevenir la luteolisis. El embrión equino cubre por migración la superficie uterina durante el periodo esencial de mantenimiento luteal. (Sharp et al., 1989).

El factor común, asociado con la luteolisis en las especies domésticas, es la pérdida de receptores de progesterona en el epitelio uterino, hecho que implica que, la responsabilidad para mantener el establecimiento de la gestación pasa de tener un control maternal a un control embrionario; y el sistema por el que el embrión de cada especie establece el control epitelial, implica los mejores mecanismos para el desarrollo de la placenta y la unión fetoplacentaria.

En la **yegua** el establecimiento de la gestación es diferente al descrito para la cerda y para los rumiantes. La señal segregada por el embrión equino parece inhibir la síntesis de prostaglandinas, y aunque el embrión segrega estrógenos durante la fase de R.M.G., una pequeña proteína (1-6 KD) embrionaria, podría estar involucrada en la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas (Sharp et al., 1989), inhibición que tienen lugar entre los días 11 y 13, coincidiendo con el R.M.G. (Goff et al., 1987). Aunque los estrógenos no afectan directamente la síntesis de  $PGF2\alpha$ , tienen un papel vital en la movilidad de los embriones al distribuir el inhibidor de la prostaglandina sintetasa a través de los cuernos uterinos, durante la gestación precoz de la yegua.

Herodoto escribía, hace 2.000 años, que “el feto debe decir su palabra para nacer”, pero hoy podríamos decir que el embrión comienza ya desde la fecundación a hablar para quedarse, modificando todo en la madre.

## **II.7.- Implantación**

La **implantación** del embrión en la pared uterina es un perfeccionamiento lógico de la viviparidad. (Amoroso 1981). Esta estrategia reproductiva asegura la nutrición y protección de los embriones y permite una economía de éstos. Por cuestiones evolutivas, la implantación presenta aspectos taxonómicos muy diversos: las diferencias son tanto de orden citomorfológico como endocrino y molecular, siendo difícil extrapolar de una especie a otra. La implantación implica una sincronización precisa entre el

estado de desarrollo del blastocisto y la receptividad uterina al comienzo del proceso.

Los dos constituyentes celulares (trofoblasto y masa celular interna) son indispensables para el desarrollo del embrión. El trofoblasto es responsable de la implantación, siendo la masa celular interna origen de las capas embrionarias, cuya interacción, asociación y desarrollo conduce a la diferenciación de tejidos, órganos y anejos embrionarios. El estado en el que el blastocisto se implanta sobre el endometrio es muy variable de una especie a otra y no guarda relación con la duración de las fases de contacto celular y de invasión del endometrio.

En los rumiantes, suidos y equidos, justo antes de la implantación, el blastocisto pierde la zona pelúcida; aunque puede estar rodeado de envolturas glicoproteicas (yegua y coneja). En el momento de la unión, ningún contacto celular se observa entre el trofoblasto y el epitelio uterino; un momento dado después de la pérdida de la zona pelúcida, el blastocisto sí actúa en el útero, orientándose no de forma aleatoria sino constante en cada especie. La posición del blastocisto en la cavidad uterina puede ser central, en las especies que presentan una gran expansión del blastocisto (coneja, yegua, cerda, vaca) o excéntrica (rata, ratona).

En las especies en las que el blastocisto sufre un crecimiento volumétrico importante antes de la nidación, ésta va precedida de abundantes secreciones uterinas que contienen particulares proteínas específicas. El papel del trofoblasto no se limita solo a ser un filtro pasivo entre la circulación materna y fetal, sino que tiene complejas funciones; además de síntesis proteicas y proteínas estructurales, asegura la secreción de hormonas esteroides y proteicas. El trofoblasto se comporta como un órgano que asegura el crecimiento del feto y sintetiza y segrega hormonas como una glándula endocrina.

La **implantación diferida** es un fenómeno que se da en muchas especies de mamíferos: marsupiales, edentados, artiodáctilos, insectívoros, roedores, quirópteros, mustélidos, úrsidos y pinnípedos. Constituye una adaptación cronobiológica que sitúa la cubrición y el parto en las estaciones en las que la alimentación permite un máximo rendimiento reproductivo.

En todas las especies hay aposición entre el trofoblasto y el epitelio uterino.

Los contactos entre trofoblasto y útero son cada vez más intensos, y un sistema de interpenetración de microvellosidades se origina, esta adhesión representa la fase de implantación epitelio-corial (suidos, équidos).

El trofoblasto tiene una gran actividad invasiva en el momento de la implantación, según las especies: corroe el epitelio uterino, atraviesa la membrana, se insinúa en el estroma hasta la pared de los vasos (endotelio corial en los carnívoros) o los penetra (placenta hemo-corial de los roedores). En los rumiantes, la actividad está limitada a un reducido número de células (binucleadas) del trofoblasto que se fusionan con las del epitelio uterino, originando una placenta sindesmo-corial parcial. La actividad de las células trofoblásticas binucleadas es calcio-dependiente, nucleótido-independiente y no es estimulada por las lipoproteínas séricas. (Ulmann and Reimers, 1989).

La implantación es el resultado del ajuste entre la diferenciación celular del trofoblasto y el endometrio bajo la acción esteroide ovárica. Aunque la evolución es independiente, se necesita una sincronización entre el desarrollo del embrión y la maduración del endometrio. Las modificaciones que suscitan la activación y la fijación de los blastocistos resultan de una modulación esteroide ovárica y de la expresión genética de las células endometriales. Los estrógenos actuarían principalmente a nivel del epitelio endometrial (primer contacto con el trofoectodermo embrionario). Las proteínas uterinas intervendrían en la decidualización e implantación.

Son muchos los factores que intervienen en el RMG, a través de mecanismos en ocasiones no bien conocidos y en los que la interacción entre el embrión con el útero y los ovarios (Thatcher et al., 1989) resulta clave en el mantenimiento de la gestación. Diversos autores han realizado revisiones generales, sobre el Reconocimiento Maternal de la Gestación, para dar una visión de conjunto (Heap et al., 1988; Heap et al., 1989; Hansel and Mickey, 1989; First and Eyestones, 1989; Flint et al., 1990; Roberts et al., 1990; Humbolt, 1991; Bazer, 1992; Espinosa, 1993; etc) o para estudiar aspectos concretos (Pérez F y Pérez JF., 2001), que permiten interpretar algunos de los mecanismos implicados como hemos visto en los apartados precedentes.

## **II.8.- Inmunología de la gestación.**

**Desde el punto de vista inmunológico**, el embrión es un extraño al organismo materno, debido a que la mitad del patrimonio genético es pater-

no. En transferencia de embriones se obtienen porcentajes normales de gestación con embriones totalmente extraños para la madre, tanto de la misma especie (alogénicos) como de distinta (xenogénicos) como ocurre con la gestación en yegua de un embrión de cebra. En cambio, después del parto, no aceptará ningún injerto tisular del recién nacido (el sistema inmunitario lo considera extraño) aunque lo haya aceptado durante toda la gestación.

Ni el espermatozoide, ni el ovocito, ni el huevo fecundado, expresan antígenos de compatibilidad, lo que no impedirá que el huevo libre, en el oviducto y en el útero sea el blanco de las células naturales eliminadoras maternas (NK o Natural Killers).

Rápidamente aparece en el suero de las hembras gestantes el factor precoz de gestación (EPF o Early Pregnancy Factor), con actividad inmunosupresora que sería el resultado de la interacción del huevo, el oviducto y el ovario. Durante la gestación tienen lugar importantes modificaciones del sistema inmunitario. Puede haber fenómenos específicos frente al padre, apareciendo en la hembra anticuerpos maternos antipaternales que aumentarán de gestación en gestación.

Cuando el huevo se implanta atrae rápidamente células NK, estas células NK serán causa de abortos inmunitarios. La placenta minimiza los efectos de un reconocimiento materno, bloqueando las células NK antipaternales y la acción citotóxica específica. Segrega varios factores (glicoproteicos y lipoproteicos) que bloquean la diferenciación de los linfocitos en células citotóxicas y son también capaces de disminuir o bloquear la acción lítica de dichas células, la placenta posee actividad de crecimiento de los fibroblastos (humanos), que podría tratarse de un factor análogo de TGF $\beta$ 2, aunque no se ha identificado como tal.

La barrera "especie" puede suprimirse si la placenta es de la misma especie que la madre, y así, asociando un trofoblasto ovino a un botón embrionario caprino la gestación puede llegar a término si tiene lugar en la oveja.

La hipótesis inmunitaria se basa en supuestos inmunológicos. En los équidos, si se transfiere un blastocisto de asno por asno a una yegua, hay siempre rechazo del embrión; en cambio, el cruce de una yegua con un asno, da un mulo, siendo la placenta pequeña e infiltrada de linfocitos; e igualmente, la gestación burra por caballo, que da el burdégano, tiene una

placenta pequeña e infiltrada, y en ambos casos el producto sobrevive. En estos casos, como en las combinaciones abortivas, hay un fuerte infiltrado linfocitario de la placenta a nivel de los cálices endometriales pero no hay rechazo; en cambio, en la transferencia de embriones asno por asno a yegua, hay infiltrado linfocitario tanto en el embrión como en la placenta, no hay formación de cálices endometriales (no crecen las vellosidades coriales) y no hay unión a la mucosa uterina; pero si la yegua ha sido inmunizada contra un asno, hay crecimiento de vellosidades coriales, unión del útero y la gestación se produce normalmente.

Todos los embriones o, de forma más general, todos los productos de la concepción (embrión y anejos) son portadores de antígenos paternos y deberían ser rechazados por la madre, ya que el útero no es un lugar desprovisto de actividad inmunitaria. (Watson y Zancosky, 1990). La forma en que estos antígenos se expresan y las modalidades de respuesta materna, condicionan el mantenimiento del embrión en el útero. Un blastocisto, a pesar de que las células NK (Natural Killers) lo reconozcan y se unan a él, es intrínsecamente resistente a la lisis; rápidamente aparece, en el suero de las hembras gestantes, el factor precoz de gestación con actividad inmunosupresora, que será el resultado de la interacción del huevo, el oviducto y el ovario.

En los rumiantes, las proteínas trofoblásticas implicadas en la regulación de la luteólisis en el inicio de la gestación son interferones trofoblásticos, que tienen las acciones, antiviral, antiproliferativa e inmunosupresora, típicas de los interferones. El efecto antiproliferativo puede controlar el endometrio hasta que el trofoblasto expandido se sitúe en los cuernos uterinos, permitiendo que el embrión tenga el tiempo necesario hasta la implantación y pueda controlar la función endometrial.

Cuando el embrión se implanta, la placenta minimiza los efectos del reconocimiento materno, bloqueando las células NK (Natural Killers) anti-paternales y su acción citotóxica específica; además, se segregan varios factores que bloquean la diferenciación de los linfocitos en células citotóxicas y que son también capaces de disminuir la acción lítica de dichas células.

### **Inmunología en la fase preimplantatoria**

El objetivo de la gestación es, para el concepto, desarrollarse hasta un nivel en el que la supervivencia fuera del útero sea posible, pero al ser la



unidad feto-placentaria un producto tanto de los genes paternos como maternos, existe potencialmente un riesgo, desde la concepción al parto, de ser un objetivo del sistema inmune. Cómo sobrevive el concepto en un útero inmunocompetente es un enigma de histocompatibilidad. Se ha enfatizado que las células del trofoblasto pueden no expresar un normal complemento de antígenos de histocompatibilidad en su superficie, minimizando la incompatibilidad celular y reduciendo la presentación de los antígenos paternales frente a las células maternas. El concepto no es un parásito, multicelular, pero, como un parásito, ha sido obligado a perfeccionar mecanismos que minimicen las confrontaciones con un potencial sistema inmune hostil. Estos mecanismos deben ser locales y no comprometer los mecanismos de defensa del huésped.

Un sistema inmune maternal no es esencial para el éxito reproductivo pero juega un importante papel durante la gestación. Los mayores candidatos para el reconocimiento maternal inmune son los antígenos del **complejo mayor de histocompatibilidad (C.M.H.)**. Los antígenos del CMH son reconocidos selectivamente por el sistema inmune de la hembra y pueden influir en el desarrollo de la gestación. (Aguilar y col., 1997).

Desde que el embrión expresa moléculas del C.M.H. de origen paternal, puede ser reconocido por el sistema inmune de la madre, pudiendo ser considerado como un injerto alógrafa. Pero en contraste con las leyes de los trasplantes, el concepto semi-alogénico no es rechazado y bajo determinadas circunstancias se desarrolla satisfactoriamente. Se considera que la madre puede tener una actividad inmunosupresora durante la gestación, sin embargo se ha demostrado que la madre es capaz de rechazar injertos alógrafos y originar respuestas inmunes para defender al feto y a ella misma, frente a infecciones.

Wegman (1988) propuso la teoría del inmunotrofismo, que manifiesta que el reconocimiento inmunológico del feto, en vez de conducir a su eliminación, contribuye al desarrollo de una gestación con éxito. En ganado vacuno se ha encontrado que aunque la retención de placenta es de etiología múltiple, la compatibilidad boLA clase I entre macho y hembra, aumenta el riesgo de retención (Joosten y col., 1991). Se sugiere que una total compatibilidad boLA entre el embrión y la madre puede representar un papel en el desarrollo de la gestación, de menor éxito que en una incompatibilidad, lo que estaría de acuerdo con el inmunotrofismo.

El rechazo inmunológico del concepto sería prevenido por varios mecanismos: menor expresión de antígenos de C.M.H. en la superficie del concepto, relacionados con el macho; creación de un medio intrauterino en el que los tejidos maternos y el trofoblasto segreguen moléculas inhibitorias de los linfocitos, reduciendo la reacción inmune en el útero; y cambios en la actividad funcional de poblaciones específicas de linfocitos maternos que induzcan tolerancia a los antígenos del concepto, inmunosupresión y liberación de citoquinas que estimulen el crecimiento del concepto y el desarrollo hormonal. (Hansen, 1997).

### III.- Biotecnologías embrionarias en los animales domésticos

Ninguna biotecnología reproductiva podrá compararse con la importancia y el impacto que supuso, hace más de 10.000 años, la domesticación y reproducción de las especies salvajes, que Solis y Selles (2005) sitúan en los siguientes momentos:

Lugar	Especie Animal	Desde hace (años)
Oriente próximo	Cabra, Oveja, Cerdo, Vaca y Caballo	10.500
China	Cerdo y Gusano de seda	9.500
Meso-América	Pavo	5.500
Andes y Amazonia	Llama y Cobaya	5.500

Si bien, es a principios del siglo XX, cuando se inicia de la primera generación de biotecnologías reproductivas, que finaliza con el control hormonal del ciclo en la década de 1960. A partir de entonces, se consideran al menos 4 generaciones biotecnológicas reproductivas más.

Desarrollo cronológico de las Generaciones biotecnológicas de la Reproducción (Palma, 2008)		
Generación	década	Acontecimientos
1ª	1900-1960	Inseminación Artificial; Criobiología Seminal; Control de Ciclo
2ª	1970	Transplante, congelación y división de embriones
3ª	1980	Sexaje de espermatozoides y embriones. Producción in vitro
4ª	1990	Clonación con células somáticas
5ª	2000	Transgénesis, Gen Farming, Células Madre

La biotecnología de la reproducción engloba el conjunto de técnicas que permiten mejorar la eficacia reproductiva, (Pérez y Pérez F y Pérez Gutiérrez JF. 1985, 2007), aunque en este documento abordaremos únicamente las relacionadas con el embrión.

### III.1.- Maduración ovocitaria: M.I.V.

Desde que el ovocito se forma durante el desarrollo embrionario y se sitúa en un folículo primordial, se bloquea su crecimiento y es incapaz de reanudar la meiosis. La reanudación de la meiosis no tendrá lugar hasta una fase avanzada de folículo cavitario, estadio folicular en el que tomando por punción el ovocito es posible reanudar la meiosis "*in vitro*", aunque la maduración será aún imperfecta y se detendrá antes de emitir el primer corpúsculo polar. En los folículos cavitarios, el ovocito depende de las células de la granulosa para finalizar la meiosis.

La **Maduración ovocitaria *in vitro* (M.I.V.)**, constituye una etapa decisiva en el proceso de producción *in vitro* de embriones, ya que requiere la simulación de los procesos que *in vivo* dan como resultado una maduración citoplásmica y nuclear coordinada y completa. El objetivo de la M.I.V. de ovocitos es suministrar ovocitos maduros, aptos para la fecundación *in vitro* (F.I.V.) y el posterior desarrollo embrionario.

La MIV propiamente dicha, consiste en el mantenimiento de los ovocitos en un medio de cultivo adecuado durante un periodo de tiempo semejante al que transcurre *in vivo* desde el pico preovulatorio de LH hasta la ovulación. *In vivo*, el ovocito está expuesto a concentraciones variables de gonadotropinas, esteroides (progesterona y estradiol), factores de crecimiento y otras moléculas que pueden actuar regulando los cambios que afectan al ovocito en la maduración y a las células del cúmulus durante el periodo preovulatorio (Singh y cols., 1993). El sistema debe soportar la dinámica de cambios requeridos para la maduración de todos los componentes del complejo ovocito-cúmulus (Luvoni y Chigioni, 2006).

Las primeras seis horas de cultivo representan el periodo crítico, durante el cual las hormonas gonodotropas deben estar presentes y activas para iniciar una maduración meiótica completa. (Szollosi y cols., 1988). Las primeras seis horas corresponden, sin embargo, al periodo de "reposo", que es cuando morfológicamente se llevan a cabo menos cambios. En contraste, las mayores transformaciones estructurales ocurren durante la segunda fase de "calma" metabólica. (Szollosi y cols., 1988).

El éxito de una M.I.V. depende de que las condiciones que soporten los ovocitos durante ese tiempo se asemejen a las que se producen durante la maduración fisiológica en el animal (Singh y cols., 1993) y para ello se

han empleado varios medios que intentan reproducir las condiciones y propiedades del fluido folicular.

La forma más común de evaluar la M.I.V. es mediante la fijación y tinción de ovocitos. Sin embargo tras el periodo de M.I.V. es frecuente hacer una valoración subjetiva de la maduración tomando como referencia la expansión de las células del cúmulus que rodean al ovocito. Gupta y cols., (2005) mencionan que la expansión del cúmulus es uno de los criterios más importantes para medir la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos.

### III.2.- Obtención y selección de ovocitos

El número de ovocitos de alta calidad recogidos por ovario es un punto clave en la producción *in vitro* de embriones. Los ovocitos empleados para M.I.V. pueden ser obtenidos *in vivo* por vía quirúrgica (ovarios de hembras ovariectomizadas) o por laparoscopia (por medio de la técnica conocida como O.P.U.), aunque estos métodos tienen el inconveniente de ser caros y el número de ovocitos recuperados por ovario es muy bajo.

A continuación resumimos algunos ejemplos de la selección ovocitaria, en función de las células del cúmulus y del citoplasma (González, 2003).

#### Selección ovocitaria en función de las células del cúmulus y del citoplasma

CARACTERÍSTICAS DEL OVOCITO	AUTOR
Cúmulus completo y Citoplasma heterogéneo	Leibfried y First, 1979
Cúmulus compacto y Citoplasma homogéneo	Hazaleger y cols., 1992
Citoplasma heterogéneo	Fukuda y cols., 1993
Cúmulus compacto y Citoplasma homogéneo	Hawk y cols., 1994
Citoplasma heterogéneo	Blondin y cols., 1995
Varias capas de cúmulus	Konishi y cols., 1996
Cúmulus compacto	Moor y Trouson, 1997
Citoplasma heterogéneo	Nagano y cols., 1999
Cúmulus compacto	Cetica y cols., 1999
Más de 5 capas de cúmulus y Citoplasma homogéneo	Mayes y cols., 2001

(González, 2003)

Generalmente el material usado en la producción *in vitro* de embriones de animales domésticos procede de hembras sacrificadas, debido a que son una fuente de ovocitos muy abundante y fácil de utilizar para la producción *in vitro* de embriones a gran escala a través de la M.I.V.-F.I.V. (Wani, 2002).

Tras la recuperación de ovocitos se procede a seleccionarlos. Generalmente, esta selección se realiza en base a sus características morfológicas, basándose principalmente en las características de las células del *cúmulus* y del citoplasma.

Los métodos tradicionales se han basado en la medición del diámetro del folículo y la evaluación morfológica del complejo ovocito *cúmulus*, sin embargo, el diámetro del ovocito no indica necesariamente si el folículo está sano y creciendo o si está atrésico. Y aunque la medición morfológica de los ovocitos es de las más utilizadas su exactitud como método de predicción de la calidad ovocitaria es aún incierto.

### **III.3.- Capacitación espermática**

El proceso de capacitación supone cambios en: las propiedades y dinámica de la membrana, actividad enzimática, aumento de:  $Ca^{2+}$ , pH, y niveles del AMPc. que conducen al consumo de energía, a la hipermotilidad, y finalmente a la reacción acrosómica de los espermatozoides (Visconti y Kopf, 1998).

Es durante este proceso, que el espermatozoide sufre los cambios necesarios que le permitirán llevar a cabo la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. Esta unión es posible gracias a un paso de iones de calcio que alteran los fosfolípidos de las membranas y de esta manera se crean puntos de fusión. En algunas especies de mamíferos la hipermotilidad de los espermatozoides intactos es inducida por los medios de capacitación que contienen  $Ca^{2+}$  (Schmidt y Kamp, 2004). La hipermotilidad aumenta el poder mecánico de los espermatozoides (Mortimer, 1997), que es necesario para traspasar la zona pelúcida de los ovocitos y por consiguiente es esencial para la fertilidad de los espermatozoides de mamíferos (Yanagimachi, 1994; Mortimer, 1997; Bedford, 1998).

### **Capacitación *in vitro***

Los espermatozoides eyaculados no son directamente fecundantes. Adquieren su capacidad fecundante *in vivo*, en las vías genitales de la hem-

bra, (en el morueco, al cabo de 5 a 10 horas) o *in vitro* (en unas 6 horas) por diversas técnicas, más o menos empíricas, al no conocerse exactamente los mecanismos de la capacitación en las vías genitales.

Se sabe que el plasma seminal contiene sustancias inhibitorias de la motilidad espermática. Después de la capacitación, se modifica la motilidad de los espermatozoides, sus movimientos se hacen más favorables a la penetración mecánica de la zona pelúcida, pasando de un movimiento lineal a un movimiento de rotación.

Como consecuencia de la reacción acrosómica, la hialuronidasa disuelve el ácido hialurónico de la membrana pelúcida y la acrosina facilita la penetración del espermatozoide, que avanza por acción propulsiva. Después de atravesar la membrana pelúcida, los gametos macho y hembra, se fusionan. En el momento de la fecundación, los gránulos corticales se descargan en el espacio peri-vitelino y provocan reacciones enzimáticas en la membrana pelúcida, impidiendo la penetración de otros espermatozoides y bloqueando la poliespermia.

La inducción de la capacitación *in vitro* implica métodos fisiológicos y no fisiológicos incluyendo la eliminación del plasma seminal, preincubación, la simulación del ambiente oviductal, la adición de proteína, la eliminación de glucosa y la manipulación de los niveles de bicarbonato y  $\text{Ca}^{2+}$  (Tarin y Trounson, 1994). El paso inicial en la preparación del semen para la F.I.V. incluye lavar el semen en soluciones salinas con el fin de eliminar los efectos inhibitorios del plasma seminal (Bondioli y Wright, 1983; Crozet y cols., 1987) y/o los crioprotectores, así como su dilución.

#### **III.4.- Fecundación *in vitro* (F.I.V.)**

Las expectativas de producción *in vivo* de embriones se han visto defraudadas con el tiempo pues su rendimiento no era tan elevado como se suponía en un principio, debido a varias causas: el número de embriones transferibles obtenidos es bajo; la existencia de hembras que no responden adecuadamente a los tratamientos para inducir la ovulación múltiple; la necesidad de respetar los periodos de descanso entre dos recogidas consecutivas y la obligatoriedad de que las donantes estén en perfectas condiciones fisiológicas y ginecológicas. (Pérez y Pérez F y Pérez-Gutiérrez JF., 2008).

Estas circunstancias han creado la necesidad de desarrollar un procedimiento alternativo para la producción de embriones, basado en la utilización de ovocitos inmaduros, recogidos directamente del ovario con independencia de la edad y de la situación fisiológica de la hembra (Herradón y cols., 2007).

La utilización de la fecundación *in vitro* para la producción de embriones ha permitido demostrar sus numerosas aplicaciones, entre las que podemos destacar: aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de alto valor genético, producir embriones a bajo coste, obtener descendientes de hembras de gran calidad genética que deban ser sacrificadas. También permite el aprovechamiento de animales con problemas de infertilidad, incrementa la eficacia de los programas de selección mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variables alélicas de algunos genes de interés productivo, y facilita la utilización de semen sexado, etc. (Herradón y cols., 2007).

La primera F.I.V. en mamíferos se realizó en 1953 por Thibault et al.; aunque no se consiguió hasta 1985 el nacimiento de los primeros cabritos y hasta 1986, el de los primeros corderos. Últimamente, se ha conseguido, gracias al avance de las biotecnologías, el nacimiento de embriones ovinos y caprinos, obtenidos por maduración de ovocitos y F.I.V.

La fecundación es el acontecimiento más importante e íntimo de la vida, que permite el mantenimiento de la especie. Controlando *in vitro* la fecundación, se accede al progreso genético del animal y de la especie, abriendo la puerta al desarrollo post-fecundación *in vitro*.

La F.I.V. es una técnica que permite conocer mejor los mecanismos de la fecundación, pero también sirve para estudiar el ovocito y su maduración, la capacitación de los espermatozoides, la activación del huevo, el control del genoma embrionario, los mecanismos de la división celular, la influencia de los genomas materno y paterno, las interacciones entre el núcleo y el citoplasma, el papel de los mediadores bioquímicos establecidos entre la madre y el embrión, los mecanismos de diferenciación de los blastómeros, los fenómenos inmunológicos implicados en el mantenimiento de la gestación, etc.

El conocimiento de las etapas de formación de los pronúcleos, permite en algunas especies desarrollar programas de ginogénesis, androgénesis, etc.



El éxito de la M.I.V.-F.I.V. depende de completar adecuadamente la maduración del ovocito y la capacitación del semen. Aunque en el éxito de la fertilización también juegan un papel muy importante el medio utilizado, la concentración espermática, el tiempo de cocultivo semen-ovocito y la temperatura (Wani, 2002).

### **III.5.- Transplante de embriones (T.E.)**

Las primeras transferencias de embriones las realizó Heape a principios de siglo; desde entonces, se han llevado a cabo trasplantes desde el estadio de huevo, pasando por los de 2, 4, 8 ó 16 células, de mórula, o de blastocisto. Por su complejidad, difícilmente puede desplazar a la I.A. como técnica de reproducción generalizada, aunque ofrece la posibilidad de intensificar la selección animal desde la hembra. La posibilidad de congelación de los embriones ha contribuido ampliamente a la extensión de esta biotecnología.

Son muchos los objetivos del T.E.: obtención de una mayor descendencia de animales de alto valor genético; obtención y venta de reproductores; obtención de descendientes de reproductores de gran valor, con problemas para una reproducción tradicional; obtención de embriones para exportación; introducción de nuevos genes en rebaños, así como recuperar patrimonios genéticos en rebaños afectados por problemas patológicos.

Una buena sincronización uterina debe existir entre donante y receptoras, debiendo ser inferior a 48 o incluso a 24 horas la diferencia entre el día del ciclo de ambas, si queremos obtener buenos resultados. (Pérez y Pérez F. y Pérez-Gutiérrez JF., 2008).

La producción de embriones *in vitro* representa una de las técnicas más importantes en la biotecnología de la reproducción. Hoy día, es posible extraer ovocitos inmaduros de los folículos presentes en la superficie ovárica, asegurar su maduración, fecundarlos y cultivar los embriones obtenidos, realizando *in vitro* todas las operaciones. Los embriones pueden ser utilizados tanto en programas de transferencia como para obtener citoplastos para transplante de núcleos y producción de clones.

### **III.6.- Congelación de embriones**

La primera congelación de embriones de mamíferos se llevó a cabo en 1952 (Smith), pero no fue hasta 1974 (Whittingham et al) cuando se ob-

tuvo el primer nacimiento por transferencia de un embrión ovino congelado.

Para la **congelación de embriones**, debemos seguir los principios de la criobiología, aunque en el caso de los embriones juegan un importante papel para la posibilidad de supervivencia, las modificaciones físicas de las células y el grado de cristalización intracelular.

Los movimientos y los cambios de fase del agua intracelular, así como la velocidad de enfriamiento, tienen una gran importancia. En la congelación rápida, la célula está poco deshidratada y el agua intracelular forma grandes cristales que originan lesiones irreversibles de las membranas y de las estructuras intracelulares en el momento de la descongelación. Cuando la congelación es lenta, la célula tiene tendencia a deshidratarse fuertemente, lo que limita la formación de cristales y favorece una buena supervivencia en la descongelación, aunque, si la congelación lenta continua durante mucho tiempo, la célula se deshidrata demasiado y se produce un excesivo aumento en la concentración intracelular de electrolitos y muere la célula. Ante estas dos indicaciones contradictorias, la mejor solución es una congelación lenta, seguida de una muy rápida, lo que implica la formación de un escaso número de pequeños cristales, compatibles con la supervivencia celular. La cantidad de micro-cristales intracelulares no debe sobrepasar el umbral letal que varía para cada célula.

Se considera que a la temperatura del nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), todos los procesos metabólicos intracelulares se detienen, pero los movimientos de los electrones continúan.

La velocidad de descongelación debe ser muy rápida ( $2.000^{\circ}\text{C}$  por minuto), para evitar la formación de cristales (recristalización) lo que originaría a su vez, lesiones irreversibles de la célula.

Estos datos generales de criobiología celular, son más complejos cuando se trata de la congelación de embriones; dependiendo además de su estado de desarrollo, de su morfología (no es lo mismo un huevo recién fecundado, que una mórula o un blastocisto), de la presencia de células ya diferenciadas (necesitarían protocolos de enfriamiento diferentes), con relaciones distintas en superficie-volumen, a las de una célula aislada.

## **Técnicas de congelación de embriones.**

Actualmente se utiliza el acondicionamiento en pajuelas, que permiten almacenar perfectamente identificados los embriones en nitrógeno líquido. El éxito de la congelación dependerá de la naturaleza de los embriones, pero también del crioprotector y del programa de temperatura empleado en la congelación y descongelación.

Para la congelación de los embriones, se utilizan congeladores programables. El cambio de fase líquida a sólida, debe ser rigurosamente controlado. La temperatura puede bajarse de 20° C. a -7° C., a razón de unos 5° por minuto. La deshidratación celular de -7° hasta -30 ó -35° C., debe ser muy lenta (a 0.3° C. por minuto) , para limitar al máximo la cristalización del agua de las células del botón embrionario y del trofoblasto, así como la del blastocele. La inmersión final en nitrógeno líquido (-196° C.) es instantánea, con el fin de no llevar la deshidratación celular mas allá de los -30 ó -35° C.

La descongelación de los embriones es ultra-rápida (2.000° C. por minuto), a través de una inmersión instantánea de la pajuela en un baño maría a 37° C. Las condiciones de eliminación del crioprotector son importantes. Realizándose en una sola etapa, colocando la pajuela vertical en el baño maría y permitiendo que la burbuja de aire mezcle el crioprotector con la solución de sacarosa, aumentando la presión osmótica del medio extracelular y la difusión pasiva del crioprotector presente en las células embrionarias y en el blastocele.

## **Perspectivas de la crioconservación embrionaria.**

Sería importante encontrar métodos de conservación menos drásticos para los embriones que el nitrógeno líquido, ya que la viabilidad embrionaria después de las micromanipulaciones está ya alterada, más aún si se realiza un sexaje, una clonación, una transferencia de núcleos o se someten los embriones a programas de transgénesis.

Con el progreso de las técnicas de F.I.V. es importante desarrollar técnicas de conservación de gametos femeninos, pero el ovocito es una célula muy diferente al huevo: su citoesqueleto comprende un huso mitótico de microtúbulos cuya integridad es indispensable para mantener los cromosomas agrupados en la placa metafásica. Además, el huso es muy sensible a los descensos de temperatura, y la congelación puede originar daños

irreversibles tales como la dispersión de los cromosomas o una mala migración, que origine anomalías cromosómicas y mortalidad embrionaria.

El empleo de mezclas de crioprotectores pueden resultar tóxicas para los embriones, lo mismo que la utilización de crioprotectores a concentraciones elevadas. Se plantea, si determinadas proteínas anti-gel, podrían ser utilizadas como crioprotectores embrionarios. La utilización de velocidades de congelación ultra-rápidas ( $2.000^{\circ}$  C. por minuto), pueden lograrse introduciendo directamente las pajuelas en nitrógeno líquido. La congelación por vitrificación, podría también ser considerada en un futuro.

## **IV.- Nuevas biotecnologías en reproducción.**

Todas las tecnologías reproductivas que hemos abordado (transplante y congelación de embriones, así como la F.I.V.) permiten avanzar en reproducción animal y desarrollar nuevas posibilidades biotecnológicas de consecuencias casi imprevisibles. Actualmente, ya se consideran cadenas biotecnológicas, que integran varias técnicas, tales como la clonación (utiliza el control del ciclo, la capacitación *in vitro*, la maduración ovocitaria *in vitro*, el diagnóstico pre-implantatorio, la congelación de embriones, la transferencia embrionaria, los signos embrionarios de reconocimiento, métodos de diagnóstico y mantenimiento de gestación, etc.) siendo similar lo que ocurre en los aspectos relacionados con la transgénesis.

Aunque es difícil prever y cuantificar el impacto de todos estos avances tecnológicos, es previsible que efectos muy positivos, tanto directos como aplicados a otras especies (incluida la humana) puedan permitir mejorar la producción, avanzar en el progreso genético, luchar contra procesos patológicos, mejorar las posibilidades reproductivas, etc.

### **IV.1.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (I.C.S.I.)**

La **Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (I.C.S.I.)**, es la introducción directa de un espermatozoide en el ovocito después de atravesar la zona pelúcida y la membrana del ovocito (Devroey y Van Steirteghem, 2004).

La primera inyección espermática con éxito, se desarrolló mediante la microinyección de espermatozoides de erizo de mar en huevos de la misma especie (Hiramoto, 1962). Posteriormente a Uehara y Yanahimachi (1976), al trabajar con hámster, se les atribuye el primer experimento de I.C.S.I. en mamíferos. Sin embargo, no fue hasta 1988 cuando se obtuvo por primera vez descendencia viva como producto de I.C.S.I. en conejos

(Hosoi y cols., 1988) y dos años más tarde se consiguió el nacimiento de terneros vivos (Goto y cols., 1990).

Las primeras gestaciones en humanos producto de la I.C.S.I., se obtuvieron en 1992 con el nacimiento de los primeros bebés. Esta técnica es considerada una de las mayores innovaciones en el campo de la reproducción asistida en la especie humana (Palermo y cols., 1992); aunque poco tiempo después, Tesarik y cols., (1995; 1996) abrieron nuevas perspectivas al conseguir las primeras gestaciones y nacimientos tras la inyección de espermátidas mediante I.C.S.I.

En ovino, fueron Clarke y cols., (1988) quienes aplicaron la I.C.S.I. por primera vez, observaron que la inyección de un espermatozoide completo o un núcleo espermático daba lugar a la formación de pronúcleos y la subsecuente división; Catt y Rhodes, (1995) demostraron que los ovocitos de ovino fertilizados por I.C.S.I. alcanzaban el estadio de mórulas y blastocistos, y un año más tarde Catt y cols., (1996) obtuvieron el primer cordero macho producto de fecundar por I.C.S.I., con un espermatozoide sexado, un ovocito madurado *in vitro*.

Una variante muy importante del uso de esta técnica es la microinyección pronuclear, que fue la primera técnica diseñada específicamente para la transferencia de genes, generando con éxito animales transgénicos en una amplia variedad de especies de mamíferos, tales como: ratones, cerdos, ovejas, conejos, ratas, cabras y vacas (Wall, 2002).

A pesar de que durante los últimos años este procedimiento ha tenido una difusión mundial, sólo recientemente se han considerado los posibles riesgos que pueden surgir por su uso indiscriminado.

Por otro lado, una desventaja de aplicar esta técnica es que se atraviesa la zona pelúcida por medio de un trauma mecánico y como consecuencia se puede dañar y destruir el ovocito. Tanto es así, que aproximadamente solo un 30% de los ovocitos bovinos inyectados sobreviven tras este procedimiento, inclusive cuando se utilizan micropipetas muy finas en condiciones idóneas (Keskintepe y Brackett, 2000).

#### **IV.2.- Tecnología del cultivo embrionario**

En general, los medios de cultivo diseñados específicamente para la preimplantación de embriones de mamíferos tienen una composición real-

mente sencilla, ya que se basan en el equilibrio de soluciones salinas, con la adición de sustratos energéticos como piruvato, glucosa y lactato. Estos medios son suplementados rutinariamente con una fuente de proteína, comunmente en forma de albúmina sérica, para mantener la viabilidad *in vitro* de las células somáticas (Gardner y cols., 1994).

Recientemente se formularon medios de cultivo secuenciales para el desarrollo *in vitro* de embriones de mamíferos. Los estudios demostraron que un medio de cultivo para largos periodos de tiempo puede deteriorarse rápidamente dando como resultado que no sea capaz de sostener el desarrollo embrionario. Un sistema secuencial de medios supera este problema y también tiene la ventaja de modificar los sustratos energéticos y la concentración de estos sustratos, imitando así los cambios ambientales que experimenta el embrión durante su desarrollo *in vivo* cuando viaja del oviducto al útero. Estos cambios en el ambiente de cultivo sirven para satisfacer las cambiantes demandas de energía de los embriones en desarrollo, asociadas con los cambios bioquímicos y morfológicos como la transición materno-zigótica, la compactación, la formación y expansión del blastocele (Swain y cols., 2001)

#### **IV.3.- Criopreservación de ovocitos y embriones**

La **criopreservación de ovocitos y de tejido ovárico** ha sido durante mucho tiempo el objetivo de los investigadores. El éxito de la preservación y almacenamiento de estas estructuras tiene mucha importancia en el avance de las tecnologías en reproducción asistida y medicina. Los progresos en la preservación de este material podrían permitir un mejor manejo de especies ganaderas, animales de laboratorio y mejorar la conservación de la diversidad biológica, incluyendo especies en peligro de extinción, dando la posibilidad de disponer instantáneamente de una gran cantidad de ovocitos. Sin embargo, los ovocitos de mamíferos aún son de los tipos celulares más difíciles de criopreservar satisfactoriamente (Diez y cols., 2005).

La **criopreservación de ovocitos y embriones** de mamíferos, hoy en día, se ha convertido en parte integral de la reproducción asistida, principalmente en especies domésticas (Leibo y cols., 1996) y, en un apartado muy especial, en humanos. Almacenar por debajo de la temperatura crítica de  $-130^{\circ}\text{C}$  da lugar a la preservación de células y tejidos por un periodo de tiempo aparentemente indefinido, sin disminuir su viabilidad. Esto se demuestra por la ausencia del aumento de incidencias de defectos, tanto

genéticos como epigenéticos, en un gran número de animales domésticos nacidos de embriones o de espermatozoides mantenidos por décadas en nitrógeno líquido. Se sabe, por el contrario, que los acontecimientos que ocurren a temperaturas ultrabajas y el posterior calentamiento pueden causar lesiones letales o subletales. (Coticchio y cols., 2004). Ya en 1963, Mazur manejaba una teoría para explicar la muerte de las células expuestas a temperaturas subcero, atribuyendo los daños a la posibilidad de que el agua congelada dentro de las células forme hielo intracelular. Además, esta teoría predice que la supervivencia de la célula puede ser máxima cuando la formación de hielo intracelular es mínima.

Los protocolos de criopreservación para ovocitos y tejidos pueden ser clasificados a grandes rasgos como “lentos” o “rápidos” de acuerdo a la curva de enfriamiento y a la concentración de aditivos que son usados.

El principio básico de todos los protocolos es el mismo en el sentido de que tienen por objeto proteger las células de los efectos de la congelación (enfriamiento), formación intracelular de cristales de hielo, deshidratación y efectos tóxicos a altas y bajas temperaturas (Shaw y cols., 2000).

Aunque la congelación lenta convencional ha sido usada con éxito en una amplia variedad de especies (ratones, bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, ratas, conejos, gatos, antílopes, babuínos, monos tití, macacos y humanos), presenta algunas limitaciones tales como la necesidad de contar con equipo sofisticado y caro, emplear tediosos protocolos de congelación (Naik y cols., 2005), provocar daños entre los que se encuentran la formación de cristales de hielo, lesiones osmóticas, toxicidad por los crioprotectores, concentración intracelular de electrolitos, lesiones por enfriamiento, fracturas de la zona pelúcida, rotura de embriones, alteraciones de los organelos intracelulares, citoesqueleto y de los contactos de célula a célula (Vajta, 2000).

En la congelación rápida o también llamada congelación no equilibrada, las células son expuestas muy brevemente (casi siempre) a una mezcla de alta concentración de crioprotectores (mayor del 40% que representa una solución de 6 a 8 M) y son congeladas a elevadas velocidades de enfriamiento por encima de 500° C/min. (Leibo y Songsasen, 2002).

Durante la congelación a temperaturas ultrabajas, las células son expuestas a varios factores de estrés consistentes en formación de hielo intra y extracelular, deshidratación descontrolada, formación de burbujas de



gas, aumento de la viscosidad, concentración de solutos y de iones los cuales se cree que causan diferentes formas de daño celular (Shaw y cols., 2000), así como lesiones ocasionadas por la toxicidad de los crioprotectores (Naik y cols., 2005).

La mayoría de los protocolos de congelación rápida emplean soluciones con altas concentraciones de solutos (p.e., crioprotectores y azúcares) lo cual provoca la salida del agua del interior de las células como medida compensatoria. En estas soluciones, las células quedan suficientemente deshidratadas e impregnadas de crioprotectores para tolerar la inmersión directa al nitrógeno líquido o en vapores de nitrógeno. Los procedimientos de congelación no equilibrada son divididos en dos categorías dependiendo de que se forme o no hielo en la solución durante la criopreservación. Las soluciones que no forman cristales de hielo son conocidas como soluciones de vitrificación. En los casos en los que haya una cantidad medible o visible de formación de hielo durante la congelación o descongelación, este procedimiento puede ser denominado congelación rápida o congelación ultrarrápida. La evidencia basada en embriones indica que la formación de hielo durante la congelación puede causar mucho más daño que la formación de hielo durante la descongelación (Shaw y cols., 2000).

La supervivencia embrionaria depende de varios factores entre los que se encuentran: el tipo de crioprotector, especie animal, estado de desarrollo, así como el método de producción de embriones.

#### **IV.4.- Vitrificación**

Otra biotecnología es la **Vitrificación**, cuya definición física es la solidificación de una solución (formación de vidrio) a bajas temperaturas sin que se formen cristales de hielo. (Vajta, 2000). Este concepto puede ser concebido simplemente como un aumento de la viscosidad hasta que se alcanza un estado sólido. (Checura y Seidel, 2007).

Si bien es cierto que con la vitrificación se elimina totalmente la formación de cristales de hielo, una consecuencia negativa de este método de congelación es que aumenta las probabilidades de que se den casi todas las formas de lesiones, a excepción de las causadas por la formación de cristales de hielo.

Con el fin de aumentar las velocidades de congelación y calentamiento se han modificado los métodos de vitrificación, en lo que se refiere a los con-

tenedores empleados. A día de hoy se han realizado gran cantidad trabajos en los que se prueban diferentes tipos de contenedores para vitrificar, ya sea ovocitos y/o embriones, entre estos contenedores de vitrificación podemos encontrar: pajuelas de 0,25 ml. (Hochi y cols., 1996; Hochi y cols., 1998; Ito y cols., 1998; Cocero y cols., 2002; Naik y cols., 2005; Rodríguez-Dorta y cols., 2007; Seki y Mazur, 2008), microgotas de medio de vitrificación (Le Gal y Massip, 1999; Papis y cols., 2000; González, 2003), micropipetas de vidrio (GMP) (Kong y cols., 2000; Cho y cols., 2002), tubos capilares de vidrio (Hochi y cols., 2000), gradillas de microscopia electrónica (Hong y cols., 1999; Chen y cols., 2001), vitrificación en superficie sólida (SSV) (Lj y cols., 2002; Begin y cols., 2003), gel-loading tip (GL-tip) (Hochi y cols., 2004), flexipet-denuding pipette (FDP) (Liebermann y cols., 2002), sistema Hemi-Straw (Liebermann y Tucker, 2002), nylon mesh (Matsumoto y cols., 2001; Abe y cols., 2005), cryoloop (Begin y cols., 2003; Hochi y cols., 2004; Checura y Seidel, 2007), cryotop (Chian y cols., 2004; Hochi y cols., 2004; Bogliolo y cols., 2007; Muenthaisong y cols., 2007), puntas de plástico para micropipeta (Cremades y cols., 2004), agujas hipodérmicas (Pornwiroon y cols., 2006), e inclusive etiquetas de plástico (Chian y cols., 2004).

Pero sin lugar a dudas uno de los contenedores de vitrificación más utilizado es el denominado Open Pulled Straw (OPS) (Vajta y cols., 1997a; Vajta y cols., 1997b; Kong y cols., 2000; Cuello y cols., 2005; Moussa y cols., 2005; Naik y cols., 2005; Checura y Seidel, 2007; Cuello y cols., 2007a; Sánchez-Osorio y cols., 2008), incluyendo algunas de sus variantes como la Superfine Open Pulled Straw (SOPS) (Isachenko y cols., 2001; Isachenko y cols., 2003b; Cuello y cols., 2004; Cuello y cols., 2007b; Cuello y cols., 2008; Sánchez-Osorio y cols., 2008) y Closed Pulled Straw (CPS) (Chen y cols., 2001; Ramezani y cols., 2005).

#### **IV.5.- Open Pulled Straw (O.P.S.)**

El método **Open Pulled Straw (O.P.S.)** supera los inconvenientes de la vitrificación tradicional porque consigue acelerar las velocidades de congelación y calentamiento por encima de 2000°C/min (Vajta, 2000).

Las ventajas del método **O.P.S.** son:

- alta velocidad de enfriamiento al emplear un volumen mínimo de medio;
- carga fácil y rápida de ovocitos y/o embriones por el efecto de capilaridad;
- contacto directo entre el nitrógeno líquido y el medio de vitrificación, lo cual aumenta la velocidad de congelación;
- calentamiento rápido y simple;
- baja toxicidad debido a que la congelación y rehidratación se realiza rápidamente, y
- menos posibilidades de rupturas de membranas tanto de ovocitos como de embriones.

En la actualidad existen una gran cantidad de publicaciones en las cuales se emplean las pajuelas O.P.S. como método de vitrificación. En estos trabajos se han vitrificado ovocitos (en diferentes estadios de maduración) y embriones de una amplia variedad de especies de mamíferos. Los resultados obtenidos son satisfactorios y se pueden comparar con otros sistemas de vitrificación más sofisticados.

Una desventaja de éste y varios métodos de vitrificación es el posible riesgo de contaminación por el contacto directo del nitrógeno líquido y el medio de crioprotector que contiene los ovocitos o embriones. Estos peligros pueden ser eliminados con el uso de nitrógeno líquido estéril para la congelación, y posteriormente colocando el material vitrificado en contenedores herméticos antes de ser almacenados (Vajta, 2000). Otro pequeño inconveniente de las pajuelas O.P.S. lo encontramos en el momento de almacenarlas, ya que flotan en el nitrógeno líquido y es necesario colocarlas en un contenedor que impida perderlas en el tanque de almacenamiento.

#### **IV.6.- Métodos de producción de embriones**

La capacidad para almacenar algunos tipos de gametos de mamíferos en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  durante un periodo prolongado de tiempo, sin que sufran algún daño o cambio, ha impulsado la investigación de métodos de criopreservación cada vez más eficientes, adaptables a una variedad cada vez mayor de ovocitos y embriones de diversas especies. Los protocolos de criopreservación han sido adaptados con éxito a embriones en

varios estadios de desarrollo y en un gran número especies. Sin embargo, cada vez es más evidente que ciertas características fundamentales de embriones de algunas especies (p.e. en cerdos), o de embriones en ciertos estadios (p.e. las primeras divisiones en bovinos), o de ovocitos de la mayoría de especies (con la posible excepción de ratones y humanos) presentan problemas particulares para su criopreservación (Leibo y cols., 1996).

Se sabe que algunos tipos de embriones pueden ser gravemente alterados o simplemente dañados al ser enfriados por debajo de la temperatura fisiológica. Por ejemplo, embriones porcinos producidos *in vivo* y embriones bovinos producidos *in vitro* son extremadamente sensibles al enfriamiento por debajo de 14º C, mientras que los embriones bovinos y ovinos producidos *in vivo* no lo son. Esta sensibilidad al enfriamiento es dependiente del estadio de desarrollo embrionario y de las condiciones bajo las cuales se desarrolla. Además la sensibilidad embrionaria al enfriamiento parece estar correlacionada con la sensibilidad a la congelación (Poyad y Leibo, 1994).

Hoy en día se sabe que los embriones en estadios de desarrollo temprano (antes de la compactación) son más sensibles en condiciones de hipotermia debido a que su contenido intracelular de lípidos es más elevado que en los estadios de mórula o blastocisto (Cuello y cols., 2007b). Por otro lado, el hecho que tras la crioconservación aumenten los porcentajes de supervivencia de embriones en estadios de desarrollo más avanzados parece estar determinado por la gran cantidad y el tamaño pequeño de las células que conforman a estos embriones, lo cual mejora la resistencia al enfriamiento cuando se comparan con embriones en estadios tempranos conformados por pocas células pero de gran tamaño (García-García y cols., 2006).

Estas consideraciones sostienen la hipótesis que diferentes estadios embrionarios tienen diferente respuesta al mismo protocolo de criopreservación, lo cual apunta a la necesidad de modificar los protocolos de congelación ajustándolos al estadio embrionario con el que se trabaje en ese momento (García-García y cols., 2006).

#### **IV.7.- Diagnóstico preimplantatorio (D.P.I.)**

Aunque el **Diagnóstico preimplantatorio (D.P.I.)**, no se realiza aún en explotaciones animales, el D.P.I. permitiría determinar enfermedades here-

ditarias a través de cultivos de embriones in vitro. Hoy día se conocen más de 3.000 enfermedades génicas, y al menos 300 están ligadas al sexo (cromosoma X).

El **diagnóstico genético preimplantatorio (D.P.I.)** representa un progreso en la prevención precoz de enfermedades genéticas graves, en caso de progenitores con antecedentes. La práctica del D.P.I. puede estar influenciada por intereses económicos dominantes o simplemente por el deseo de tener niños con menos riesgos genéticos. El D.P.I., debería ser únicamente una técnica médica que sirva para prevenir enfermedades genéticas indiscutibles.

#### **IV.8.- Determinación de sexo en embriones**

Es de gran interés zootécnico el poder elegir el sexo del recién nacido. Los bancos de esperma o de embriones, sexados, presentan un indudable interés.

##### **Determinación de espermatozoides X e Y**

Actualmente, sólo la separación de espermatozoides X e Y por citometría de flujo presenta una eficacia real, aunque los resultados no son fiables al 100%. Este método se basa en la diferencia en ácido nucleico: los espermatozoides Y contienen de un 3% a un 4% menos ADN que los X, tanto en el morueco como en el macho cabrío. La fluorescencia de cada espermatozoide se mide por citometría de flujo, siendo cuantificada a través de un sistema informatizado, separando posteriormente los dos tipos celulares a través de un campo eléctrico. El método resulta limitado, debido al pequeño número de espermatozoides que se pueden analizar, y no es compatible con la I.A. Su coste resulta aún prohibitivo y, además, la presencia de fluorocromo en el ADN aumenta la mortalidad embrionaria.

##### **Sexaje de embriones**

La determinación del sexo de los embriones permite aumentar considerablemente el porcentaje de descendientes de una hembra para ese sexo. Por razones ligadas a la técnica de transferencia y a la edad del embrión (debe tener la zona pelúcida) y también a la conservación (congelación), el número de células del blastocisto es pequeño (120 a 160) y las posibilidades de biopsia limitadas. Las técnicas que pueden emplearse en ru-

miantes, actualmente son: el análisis citogenético, la dosificación enzimática y la hibridación *in situ*.

El análisis citogenético es fiable al 100%, permite visualizar los cromosomas sexuales (es el método de referencia); pero se utiliza poco por las dificultades de su realización. Para obtener un cariotipo, es necesario hacer que las células embrionarias se dividan y poder observar una célula en metafase con los cromosomas en la placa ecuatorial, además el rendimiento de la técnica es débil (30%) al poder disponer como máximo de una biopsia de 10 a 20 células (sin afectar la supervivencia del embrión).

La dosificación enzimática, se basa en que el nivel de expresión de los enzimas que se codifican con el cromosoma X de la hembra (XX), es doble que en el macho (XY), durante el periodo de desarrollo embrionario en el que los cromosomas X son activos. La determinación de glucosa 6P-deshidrogenasa, ha permitido sexar correctamente embriones de ratón. Lamentablemente el método no está aún en fase de utilización zootécnica.

### Comparación entre diferentes métodos de sexaje de embriones

Criterios	Método ideal	Método de sexaje de embriones		
		Citogenético	Hibridación	PCR
Fiabilidad	100	+++++	++++	++++
Rapidez	Unas horas	-	++	++++
Simplicidad	Automático	-	++	+++
Análisis (nº)	Más de 1000		++	++++
Embrión (cls)	0	20-50	10-15	1-10
Ventajas	Elección de sexo antes de fecundar	Fiabilidad 100	Sin cultivo No radioactivo Método a punto	Automático Método a punto
Inconvenientes	Ninguno	Duración Dificultad técnica Muchas células Método lento A posteriori	Técnica delicada Manipulación del embrión Elección de sexo a posteriori	Manipulación del embrión Elección de sexo a posteriori

## Sexaje de embriones por Selección de Espermatozoides

Crterios	Método ideal	Selección de Espermatozoides
Fiabilidad	100	++
Rapidez	Unas horas	+++
Simplicidad	Automático	++++
Análisis (nº)	Más de 1.000	++++
Embrión (cls)	0	0
Ventajas	Elección de sexo antes de fecundar	No perjudicable para el embrión Elección sexo antes fecundar Aplicable en gran número
Inconvenientes	Ninguno	Fiabilidad débil Método aún no puesto a punto

Una técnica de hibridación in situ capaz de detectar el cromosoma Y en una biopsia embrionaria de una decena de células fué puesta a punto (Burns et al, 1985). Consiste en hacer reaccionar una sonda molecular, no sobre ADN purificado sino sobre células fijadas. El líquido de hibridación con la sonda se deposita sobre las células. Las preparaciones se calientan a 100º C. (10 minutos) para desnaturalizar los ADN y posteriormente se mantienen a 42º C. (4 a 12 horas), para obtener la hibridación.

El sexaje de embriones por PCR, se basa en amplificar exponencialmente el ADN del cromosoma Y. La técnica de PCR, permite amplificar hasta 1 millón de veces una región elegida de ADN. El ADN se desnaturaliza a temperatura elevada (94º C. durante 1 minuto); añadiendo posteriormente una solución con sondas específicas, nucleótidos libres y Taq polimerasa. En una primera fase (1 minuto a 50-60º C.) las sondas se hibridan con las secuencias de ADN complementarias; más tarde se sintetizan las cadenas de ADN gracias a la acción de la polimerasa (2 minutos a 70-75º C.); este ciclo debe repetirse sucesivas veces (50-60) si se quiere efectuar la reacción a partir de solo 1 ó 2 copias de ADN, es decir el correspondiente a una célula haploide o diploide (10 pg de ADN). Una determinación de sexo de los embriones puede hacerse rápidamente y de forma automática. El sexaje por la técnica de PCR, está en pleno desarrollo a nivel zootécnico.

### IV.9.- Clonación de embriones (C.E.)

La supervivencia de los blastómeros depende de la zona pelúcida (estructura que debe estar presente en los primeros estadios del desarrollo) y de

la posible adhesión de los blastómeros a las células epiteliales del oviducto, lo que supone una parada en su división. Un blastómero transplantado sin zona pelúcida o en una zona pelúcida muy abierta, es incapaz de desarrollarse, por lo que se emplea la técnica de Willadsen de inclusión en agar-agar para cerrar las zonas pelúcidas, habiéndose obtenido nacimientos de gemelos homocigóticos en la oveja, gracias a esta técnica.

### **Producción de gemelos por bisección.**

Para evitar el cultivo in vivo y las inclusiones en agar-agar, Ozil perfeccionó el micromanipulador de Fombrune (1945), permitiendo a través de una limitada abertura atravesar la zona pelúcida. El embrión se sujeta por depresión con una micropipeta, abriendo la membrana pelúcida siguiendo un plano ecuatorial, con la ayuda de dos micro-agujas; posteriormente y con la ayuda de una micropipeta, se penetra en el interior de la zona pelúcida y se expulsa el embrión por una ligera inyección de medio. La membrana pelúcida vuelve a cerrarse por sí sola. Los embriones en estado de mórula se dividen en dos por simple presión con micro-agujas; mientras que los blastocistos se seccionan, con la ayuda de un micro-bisturí, por la mitad del disco embrionario. Cada mitad de embrión se sitúa en una zona pelúcida vacía, que pueden conseguirse de ovocitos obtenidos en ovarios de matadero.

La **producción de gemelos por bisección**, como método de duplicación embrionaria, es el más eficaz y económico para obtener gemelos homocigóticos, y al ser débil la supervivencia de los embriones congelados, es mejor realizar la transferencia el mismo día de la bisección, pudiendo además tomar algunas células y determinar el sexo al mismo tiempo. Tanto en ovinos como en caprinos, se han llevado a cabo con éxito experiencias de este tipo.

### **Clonación por transferencia de núcleos.**

El objetivo zootécnico es obtener un gran número de copias de un individuo de alto valor genético, pero existen aún numerosas dificultades técnicas. (Pérez y Pérez F, y cols., 2005).

Es teóricamente posible obtener, 10, 100 o incluso 1.000 individuos idénticos a partir de uno solo, congelando embriones (hijos, nietos, etc.) que a su vez serán clonados, y así indefinidamente. Esto podría suponer un cambio radical en la ganadería del futuro, aunque también un preocu-



pante empobrecimiento genético de la población animal. La diversidad genética entre razas e individuos es una riqueza que debemos proteger de forma prioritaria, y la clonación puede suponer un riesgo para poder mantener el suficiente polimorfismo genético de las poblaciones animales. La creación de embriotecas puede mantener las diferentes razas, pero la diversidad individual no será suficientemente salvaguardada.

Actualmente, se utiliza más el programa de clonación todo *in vitro*: maduración ovocitaria, transferencia de núcleos de blastómeros provenientes de mórulas congeladas, desarrollo embrionario hasta los 6-8 días, selección de embriones *in vitro* y trasplante de embriones en útero a hembras receptoras.

A pesar del débil rendimiento para su utilización práctica, es posible realizar la clonación de embriones. Será necesario, integrar toda la cadena tecnológica de la reproducción asistida: maduración *in vitro*, desarrollo embrionario *in vitro*, sexaje, congelación, trasplante embrionario, reproducción, seguimiento *in vivo* e *in vitro* de la supervivencia embrionaria, etc. Numerosos problemas prácticos, e incluso teóricos, deberán ser resueltos, tales como: la activación del ovocito, los mecanismos de diferenciación de los núcleos de los embriones donantes, el cultivo de las células totipotentes ES, las mortalidades embrionarias y fetales, la naturaleza de los signos embrionarios, etc.

### Primeras clonaciones embrionarias en animales domésticos (Heyman y col. 1991)

Especie	Fase de desarrollo del embrión donante	Nacidos	Clones	Autor
Vaca	4-16 células	2	-	Prather y col., 1987
	16-64 células	92	7	Bondioli y col., 1990
	32-64 células	-	-	Simms y col., 1991
	8-64 células	101	4	Willadsen y col., 1991
	32 células		5	Heyman y col., 1993
Oveja	8-16 células	3	2	Willadsen y col., 1986
	16 células	2	-	Smith y Wilmut, 1989
	Botón del blastocisto	1	-	Smith y Wilmut, 1989
	32 células congelado	2	1	Heyman y col., 1990
Coneja	8 células	6	-	Stice y Robl, 1988
	32 células congelado	8/207	6	Heyman y col., 1990
	32 células fresco	10/139	6	Collas y Robl, 1991
	Botón del blastocisto	-	-	Collas y Robl, 1991
Cerda	4 células	1/88	-	Prather y col., 1989
Cabra	8-32 células	5/24	2	Yong y col., 1991

<b>Cronología de nacimiento de clones en las diferentes especies (Palma, 2008)</b>		
<b>Especie</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>
Ovina	Wilmut y cols.	1997
Bovina	Cibeli y cols.	1998
Caprina	Baguisi y cols.	1999
Porcina	Polejaeva y cols.	2000
Felina	Shin y cols.	2002
Leporina	Chesne y cols.	2002
Equina	Galli y cols.	2003
Mula	Woods y cols.	2003
Murina	Zhu y cols.	2003
Canina	Lee y cols.	2005

#### **IV.10.- Transgénesis**

La técnica de la **Transgénesis** permite crear un individuo que ha recibido una información genética nueva, como consecuencia de la introducción experimental de ADN diferente al de su patrimonio genético.

En producción animal, son previsible importantes resultados a través de la transgénesis, investigándose principalmente en los siguientes campos: mejora de las producciones animales clásicas (leche, carne, lana, huevos); aumento de la resistencia de los animales a ciertas enfermedades, y producción de proteínas de alto valor (factores de coagulación, antitripsina, etc.).

El interés de los animales transgénicos reside en la obtención de progreso genético en los rebaños, pero es conveniente ser muy prudente en la introducción de animales transgénicos en las ganaderías ya que determinados individuos (no viables, anormales, infértiles, etc.) pueden perturbar producciones consolidadas. Es imprescindible comprobar previamente los animales transgénicos antes de su desarrollo y diseminación en razón a las posibilidades de las biotecnologías abordadas (I.A, congelación, transferencia de embriones, etc.). Es absolutamente necesario controlar rigurosamente todos los parámetros fisiológicos, susceptibles de ser modificados por la introducción de un transgén en el patrimonio genético de una población, ya que cualquier error podría ocasionar efectos catastróficos en el espacio y en el tiempo.

La mejora de las calidades zootécnicas de los rebaños por la introducción de animales transgénicos es aun especulativa aunque se pueden conside-

rar algunos objetivos interesantes: aumento de la cantidad de carne en la canal; disminución del contenido en colesterol; disminución de la grasa; aumento en la producción láctea; disminución del contenido en lactosa de la leche; mejor calidad de lana o de la piel; mejor eficacia nutritiva y de conversión; etc.

Vemos que existen múltiples perspectivas para mejorar la producción animal, a través de programas de transgénesis pero, antes de su introducción en las explotaciones, hay que precisar cuáles son los genes que deben ser elegidos, cuáles son sus efectos y cómo afectan a las funciones fisiológicas relacionadas con su acción.

#### **IV.11.- Control de sexo y triploidización**

En acuicultura industrial, el **control del sexo**, permite la producción de peces de sexos diferentes: hembras masculinizadas (neomachos productores de semen monosexo) y estériles (hembras triploides), se lleva a cabo por masculinización indirecta (con andrógenos) y por esterilización (por temperatura, presión o gas) o técnicas combinadas. El mejor periodo para la intervención endocrina, coincide con el periodo previo a la diferenciación sexual morfológica y que en los salmónidos se sitúa de la pre a la post eclosión (Piferrer and Donalson, 1993), para llevar a cabo la feminización o la masculinización, se somete a los alevines a una inmersión durante dos horas en un baño esteroide. Nosotros (Espinosa y cols, 1999), para producir neomachos, vehiculamos el andrógeno (metil testosterona) al primer alimento, suministrándolo durante 3-4 meses. Mientras que la testosterona resulta ineficaz para producir la masculinización, la 11-ketotestosterona es eficaz, y andrógenos no aromáticos como la 17 $\alpha$  metil hidrottestosterona, inducen la masculinización sin aparente feminización (Piferrer et al., 1993).

Las hembras masculinizadas desarrollan testículos aunque por la ausencia de conductos deferentes la obtención seminal debe realizarse quirúrgicamente. La fecundación de hembras (XX), productoras de huevas (X), con neomachos (XX) productores de semen (X), daría origen a poblaciones todo hembras (XX), aunque hemos constatado la presencia de algunos machos, entre la descendencia (XO?). También es posible obtener neohembras (machos feminizados) administrando 17 $\alpha$  etinil E<sub>2</sub>, y aunque se realiza en diversas especies, actualmente no presenta una aplicación

industrial en los salmónidos. La obtención de machos YY, partiendo de neohembras XY, permite según Melard (1995) conseguir poblaciones con un 100% de machos.

Para la **producción de triploides**, se necesita previamente conseguir una generación monosexo (XX), para lo cual se producen neomachos y al fecundar una hembra (XX) con semen de neomacho (XX), se obtiene una población monosexo (XX), cuya manipulación cromosómica posterior, permite obtener individuos **triploides** (XXX) estériles.

Las técnicas más utilizadas consisten en someter, unos minutos después de la fecundación, los huevos de trucha arco iris (*oncorhynchus mykiss*) a un shock térmico (26,5º C.), a un choque hiperbárico (9500 p./s.i.), o a una atmósfera de gas nitroso, durante diversos periodos de tiempo (desde unos minutos a 1 ó 2 horas, según las diferentes tecnologías), obteniéndose índices de triploidía que varían entre un 60 y un 90%. Nosotros (Espinosa y cols., 1999 y 2005) con técnicas combinadas, hemos conseguido un 100% de individuos estériles.

## V.- Reflexión general

Queremos en el siguiente apartado, plantear una **reflexión general sobre el Embrión y las biotecnologías embrionarias**. Hemos intentado exponer algunos aspectos sobre el Embrión en el contexto del inicio del tercer milenio. Momento en que filósofos, periodistas, políticos, teólogos, juristas, médicos, biólogos, psicoanalistas, etc., han hecho del Embrión el tema de múltiples debates en la sociedad. Puede ser interesante una contribución escrita con las aportaciones de los investigadores (Martal, 2002).

Los científicos huyen de respuestas breves. Sus convicciones éticas están presentes y, bajo discusiones diplomáticas, quieren entrar en la complejidad de las cosas, pero algunos avances espectaculares pueden resultar peligrosos o inquietantes. Piensan que no es verdaderamente el conocimiento lo que es peligroso sino sus aplicaciones. Temen, primero, el oscurantismo, la mala fe, las ambiciones, la tecnocracia, el poder excesivo del dinero y de la Administración. Consideran legítimos los debates de la sociedad, las barreras jurídicas, pero temen también a los espíritus psicodirigidos capaces de paralizar los futuros avances de la ciencia. Son éstos sus problemas y contradicciones, sus dudas y sus convicciones.

**¿Qué es el Embrión?** Los embriólogos hablan de un huevo segmentado en 2, 4, 8, 16,... células, de mórula o conjunto de blastómeros. Estas células son totipotentes o multipotentes, según su grado de diferenciación y su capacidad de generar un organismo completo. Los blastómeros segregan el blastocele y originan el blastocisto. Los blastómeros periféricos originan el trofoectodermo primitivo, y los demás, constituyen la masa celular interna (M.C.I.) o botón embrionario.

La M.C.I. origina el verdadero embrión con los órganos más o menos formados. Cuando la organogénesis del embrión se acaba, se habla entonces de feto (según los anatómicos), que crece y se desarrolla a lo largo de la gestación con una maduración progresiva de las funciones fisiológicas. El

trofoectodermo primitivo origina las envolturas embrionarias, amnios y alantoides y, sobre todo, la placenta.

La primera **Fecundación in vitro (F.I.V.)** la realizó Thibault (1959) en el conejo. Edwards, 20 años más tarde (1978), obtuvo los primeros bebés probeta.

Después del éxito de la F.I.V., juristas, teólogos, filósofos e incluso políticos se pusieron a definir lo que es un embrión, lo que llevó a una cierta confusión terminológica. Se ha llegado incluso a hablar de “grumo de células” para justificar la clonación no reproductiva, a partir de células totipotentes de la masa celular interna. Algunos consideran todo embrión humano con dignidad de persona, incluso no potencial, que es sagrada desde el momento de la concepción. En el polo opuesto están quienes opinan que el embrión humano no es una persona incluso si tiene el aspecto de un niño, sino que es un grumo de células más o menos constituido. Las definiciones de los juristas varían según las leyes, que cambian con las épocas, los países y los dictámenes médicos del momento.

Existe además el embrión abandonado, congelado en un recipiente de nitrógeno líquido, dependiendo si los padres lo toman, o no, para una nueva tentativa de gestación. Los padres satisfechos se desprenden de este niño en potencia, mientras otros lo reivindican. Estos embriones congelados, después de más de cinco años, son una fuente de gasto, delito o crimen, según el punto de vista con que se miren, y algunos los quieren para la ciencia médica.

Los biólogos de la reproducción fueron los primeros en solicitar un Comité Ético, como consecuencia de los trabajos de Palmiter y Brinster (1982) sobre transgénesis en ratones gigantes, publicado en *Nature*, y de las peticiones de utilización para los embriones humanos de las biotecnologías reproductivas empleadas habitualmente en la congelación de embriones bovinos.

### **Del ovocito al cigoto**

El desarrollo embrionario, hasta el nacimiento, depende de una cadena de acontecimientos moleculares estrictamente programados, que son desencadenados en la fecundación. Pero la regulación comienza en la fase de crecimiento del ovocito, durante la maduración citoplásmica, que

significa la síntesis, el almacenaje y la estabilización de un gran número de transcripciones y de proteínas.

En efecto, al final del periodo de crecimiento, los ovocitos sufren en todas las especies una disminución de actividad de transcripción. Los ovocitos, situados en grandes folículos cavitarios, se subdividen en dos clases según la organización de su cromatina: aquéllos cuya cromatina no está condensada en la periferia del N.L.B. (Nucleolus Like Body) que tienen actividad transcripcional, mientras que los que tienen un anillo de cromatina perinucleolar muy condensado, son inactivos a la transcripción.

En todas las especies, la transcripción zigótica no se activa inmediatamente después de la formación de los pronúcleos del cigoto, sino en un momento que depende de cada especie: al final del estadio de 1 célula en la ratona y coneja o de 2 células en la oveja. El repertorio de estrategias utilizadas en el curso de la transcripción entre ovocito y cigoto, se extiende más allá del control de la estabilidad y localización de las proteínas, pasando por la regulación diferenciada de la estabilidad de los ARN mensajeros.

### **Biología del desarrollo precoz**

Abarca esencialmente al embrión en los estadios de: huevo fecundado, mórula, blastocisto y células totipotentes de la masa celular interna. Es precisamente en estas fases en las que tienen lugar las principales manipulaciones nucleares y celulares.

### **Mecanismos de activación del ovocito fecundado**

Se sabe desde hace tiempo que el genoma embrionario no se activa instantáneamente después de la fusión de los pronúcleos macho y hembra. Se activa en las fases de 1 célula en la ratona y en la coneja y en la de 2-4 células en otras especies. Pero la transcripción de los ARNm maternos y la traducción de los ARNm ya presentes en el ovocito, son estimuladas muy precozmente por la fecundación. La disección de estos mecanismos de interacciones núcleo-citoplasma necesita marcadores perfectamente caracterizados para comprender la "coreografía" de la maquinaria de transcripción materna. Estas regulaciones condicionan la aptitud de los ovocitos para el desarrollo embrionario. En las clonaciones embrionaria y somática, los mecanismos de diferenciación de un núcleo están amplia-

mente establecidos, lo mismo en la totipotencia y en la diferenciación para la terapia celular.

La clonación embrionaria comienza a ser muy conocida, por lo que nos parece más interesante centrarnos en las consecuencias fisiopatológicas de la clonación somática, que permiten ilustrar las numerosas dificultades técnicas potenciales de la clonación somática humana, lo cual refuerza su desaprobación ética. La clonación permite comprender mejor ciertas patologías y demuestra también cómo no controlamos la reprogramación del núcleo de las células somáticas animales. Las interacciones entre la clonación, la transgénesis y la terapia celular, permiten comprender mejor la complementariedad de las diversas estrategias.

**La biología evolutiva del desarrollo del embrión** supone una aproximación transdisciplinar entre la genética, la embriología, la sistemática y la biología evolutiva. Sobre la base de la filogenia molecular, los árboles filogenéticos deben ser sensiblemente revisados. La extraordinaria conservación de los genes del desarrollo, como son los genes HOX, se extiende a los Bilateria: moluscos, vermes, artrópodos, vertebrados (tales como el hombre), todos poseen conjuntos de genes HOX extremadamente similares entre sí en el número y en la disposición. Resulta impensable que los genes que originan el cuerpo de un ser humano sean los mismos que los que producen el cuerpo de una mosca; impensable, que procesos tan diferentes como los que intervienen en el desarrollo de estos dos organismos, estén controlados por una misma estructura genética. (Jacob 1997)

Dos grandes categorías de genes del desarrollo han sido identificados por cribado genético en diversas especies. La primera categoría corresponde a reguladores de transcripción (proteínas, receptores nucleares, esteroides, etc.); la segunda, a las señales intercelulares tales como los factores de crecimiento (como los de la familia de los TGF- $\beta$ ), los factores de transducción o los receptores de membrana. La forma no está codificada, pero existen redes muy antiguas en el plano evolutivo. Nos encontramos ante un conjunto de interacciones génicas y de sistemas de información que conducen a la puesta en marcha de programas celulares específicos, en el lugar y momento adecuados. En el plano molecular, parece mucho más fácil, actuar sobre la regulación de la expresión de un gen, modificando discretamente su promotor, que cambiar su parte codificada. La pregunta sigue siendo: ¿cómo se puede generar tanta diversidad con los mismos elementos?



**El desarrollo espacio temporal del embrión ovino** estudiado mediante microscopía electrónica, del día 12 al día 23 de gestación durante el periodo preimplantatorio. El botón embrionario es claramente visible, así como la línea primitiva, el canal neural, los arcos viscerales separados por surcos similares, en embriología comparada, a las hendiduras branquiales de los peces.

Los mecanismos de la embriogénesis, tales como la formación de la piel o de los músculos esqueléticos de los vertebrados se han estudiado por el método de quimeras de ratón-pollo. El injerto en un huevo de pollo suministra un medio adecuado para el desarrollo de las células de ratón. Los sistemas de señalización aparecen claramente comunes en las dos especies.

**El diálogo madre-embrión** corresponde a las interacciones inmunoendocrinas entre el embrión y la madre. Muchos mensajes intervienen en fases críticas y precisas, como la muerte embrionaria o fetal. La endocrinología comparada de diversas estrategias en los mecanismos de reconocimiento maternal de la gestación, tanto en la especie humana como en numerosas especies animales, pone de manifiesto una asombrosa complejidad de los mecanismos de adaptación a la gestación. Numerosas hormonas están implicadas: primero, la progesterona, que es indispensable en la gestación, después el balance entre las prostaglandinas luteolítica ( $F_{2\alpha}$ ) y luteotrófica ( $E_2$ ), las hormonas hipofisarias LH y PRL; las hormonas placentarias CG y PL, las hormonas ováricas estradiol y oxitocina (luteal o endometrial, según las especies); los factores embrionarios, como los estrógenos, y las prostaglandinas y los interferones (IFN), principalmente el IFN $\tau$ , como señal de reconocimiento de gestación.

La paradoja inmunológica del no rechazo del concepto, debido a su naturaleza de injerto semi-alógrafa, se aborda a través de las diferentes teorías inmunológicas, sucesivas pero no exclusivas: la barrera neutra, el equilibrio Th1/Th2, las NK, los linfocitos T CD4 y CD8, las citoquinas de origen endometrial y trofoblástico. El control de la tolerancia materno-fetal se basa en numerosos mecanismos celulares y moleculares, que parecen conjuntados para reforzar la inmunosupresión en la interfase trofoblasto-endometrio.

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II, las sustancias placentarias inhibitoras de complemento DAF, MCP, l'HLA-G, el CCRy,

los receptores KIR y KAR, el PIBF y el TJ6, las citoquinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, el LIF, el TGF- $\beta$ 2, el GM-CSF, el CSFI, el IFN- $\tau$ , el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , están implicados así como las hormonas PGE2 y la P4. En suma, una especie de retahíla de moléculas que conducen al éxito o al fracaso de la supervivencia del embrión o del feto. La naturaleza, la localización y el equilibrio de estos factores varían según las especies. Forman verdaderas redes de regulación. Lo que parece más asombroso es que funcionan a pesar de tal complejidad.

La fisiología de la circulación maternal y fetal asombra por la amplitud de su adaptación a la gestación. La fisiología circulatoria uterina, ovárica, umbilical, útero-placentaria normal y patológica, la hemodinámica y los intercambios gaseosos entre la madre, la placenta y el feto. Las exploraciones cardiocirculatorias fetales por ecografía bidimensional o tridimensional, combinadas con efecto Doppler y análisis espectrales, permiten la definición de toda una serie de índices sobre la velocidad sanguínea característica de los diferentes compartimentos vasculares y de las situaciones fisiopatológicas.

La **epigenética**, o influencia del medio en el control de la herencia, ha tenido en el curso de la evolución biológica un papel clave en el desarrollo de los individuos y en su adaptación al medio.

La cuestión clave es cómo puede cambiar de actividad un gen y cómo puede ser transmitido el cambio a través de mitosis y meiosis a la descendencia, o lo que es lo mismo como pueden las variaciones del medio influir en la herencia.

La herencia epigenética puede definirse como la heredabilidad independiente de la secuencia del ADN. Pero ¿cuáles son los mecanismos moleculares susceptibles de participar? Se han descrito: la metilación de las citosinas del ADN y la acetilación de las histonas. La impronta epigenética paterna o materna puede afectar por metilación de algunos alelos, originando el bloqueo de su función, siendo numerosos los genes que son susceptibles de sufrir esta influencia parental. Todos los sistemas de regulación de la célula pueden verse afectados: hormonas (insulina), factores de crecimiento (IGFII), receptores (R-IGFII), factores de transducción (proteína G), canales iónicos ( $K^+$ ), factores de transcripción (NFkB).

Por ejemplo pequeñas variaciones de amplitud y de frecuencia de estímulos cálcicos en el curso de la primera hora que sigue a la activación del

ovocito de coneja después de la fecundación, pueden influir de forma positiva o dramática en el desarrollo embrionario. Las consecuencias pueden ser más tardías: duplicación del índice de implantación y de gestación. Los mecanismos moleculares de la herencia epigenética nos aportan nuevas vías de comprensión de los mecanismos de adaptación al medio.

El desarrollo embrionario de los organismos superiores conduce al establecimiento de un gran número de tipos celulares diferentes a partir del cigoto: célula única y totipotente. En el curso del desarrollo, todas las células equipadas con el mismo patrimonio genético van a ser orientadas para seguir una diferenciación específica.

El problema fundamental de la genética del desarrollo es comprender cómo la multitud de células diferentes, tanto física como fisiológica y morfológicamente, que constituyen el organismo, pueden desarrollarse a partir de una misma célula, teniendo todas ellas el mismo genoma. Según la visión actual de la genética, la diferenciación celular es el resultado de la expresión diferencial de los genes, aunque el ADN sea considerado como el portador físico de la herencia y su secuencia sea la misma en todas las células.

Parece que es necesaria la intervención de factores extragenómicos para explicar la expresión diferencial de los genes. Esto significa la existencia de otra herencia, además de la del ADN, aunque éste sea considerado el principal portador de la herencia. Por eso la herencia epigenética se podría definir como la herencia independiente de la secuencia del ADN.

La **herencia epigenética en los mamíferos**. Los genes se activan o inactivan en respuesta a cambios, ya sea en el interior de la célula, como son las modificaciones metabólicas, ya sea en el medio exterior, como son los cambios de temperatura, composición del medio, etc. En un organismo pluricelular, el medio de cada célula está formado también por otras células. No es sorprendente que los efectos de las interacciones celulares durante la embriogénesis pasen a menudo por mecanismos moleculares epigenéticos, de forma que estos mecanismos, además de asegurar la transmisión del estado de actividad de los genes durante la división celular, representen el papel de "relé" entre el medio y el genoma. Este doble papel biológico permite adaptar mejor la expresión del genoma a las necesidades actuales determinadas por el medio, pero también permite extender este efecto más allá del ciclo de la vida de la célula e, incluso, de

todo organismo pluricelular, haciendo posible la transmisión de la adaptación a la siguiente generación. La herencia epigenética podría contribuir, al menos a corto plazo, a una mejor adaptación al medio. Podría también contribuir a una canalización de los procesos de desarrollo del individuo, o de la evolución durante generaciones con condiciones cambiantes del medio (Waddington, 1956).

Como he indicado al comenzar este capítulo de reflexión general sobre el embrión y las biotecnologías embrionarias, no queremos finalizarlo sin realizar un comentario sobre las **implicaciones éticas de la Clonación en la especie humana**. En las distintas religiones existen diversas posiciones, subordinadas a valores superiores. En el Judaísmo y Cristianismo hay un doble principio básico que lo podemos encontrar en el libro del Génesis. Por un lado se afirma que: “vio Dios que era bueno” todo lo creado (Génesis 1: 1-31). Junto a esto se establece que, el arrogarse el ser humano la categoría juez supremo sobre el bien y el mal, es lo que constituye el pecado en sus orígenes (Véase Gen 2: 17).

Para el Islam (sometimiento a la realidad Única), de acuerdo con el Corán, cada musulmán debe formarse una opinión, siendo su consideración más una cuestión ética que religiosa. Para ciertos musulmanes, transcurren 40 días antes que el espíritu (*rhu*) sea insuflado en el embrión, mientras que para otros son 120 días, por lo que la clonación y la transferencia nuclear no constituye un conflicto per se (Boukhari, 1999).

Para el Budismo, la reflexión bioética es muy amplia. Predominan los consejos pero no existe una directriz para sus fieles, pronunciándose más por la reserva y la prudencia. Los textos hindúes, como los budistas, invitan más a la reflexión. Además, en el budismo, la vida comienza en el momento del nacimiento.

Para el Judaísmo actual, las cuestiones bioéticas se resuelven recurriendo a los textos de la Torah y a su interpretación por las autoridades. El punto de vista del Judaísmo se basa en la *Misnah*, que enfatiza lo que está prohibido. Según Boukhari (1999) la creencia judía según el Talmud afirma: “después del cuadragésimo día es considerado que los embriones tienen alma y una conciencia”; antes, para Schenker (2005) son considerados “no más que agua”. En 1988, Israel prohibió la clonación humana y en 2004, el Parlamento israelí, extendió la ley no sólo a la clonación de un individuo

entero sino también a los cambios que afecten a las células reproductivas (Schenker, 2005).

El Catolicismo, (Pontificia Academia *Pro Vita*, 2000) al cuestionarse si es moralmente lícito producir y/o utilizar embriones humanos vivos, se manifiesta en contra de la producción y uso de las células embrionarias humanas con fines terapéuticos, por las siguientes razones: Dado que el proceso de desarrollo embrionario, es un continuo, la Doctrina católica opta por otorgar dignidad de persona a la realidad humana desde su momento inicial (Bastero, J.J. 2010).

Volviendo a lo que nos dice la ciencia, hasta ahora no hay suficiente evidencia que garantice que la clonación terapéutica es la solución para tratar determinadas enfermedades, ni tampoco que el empleo de células madre no tenga efectos secundarios negativos. Además, la investigación y desarrollo en transferencia nuclear, con aplicación a la medicina humana, no debe ser en ningún caso un negocio privado.

Según Palma (2008), importantes problemas se han detectado en clones bovinos, ovinos y murinos, siendo los principales: las anomalías placentarias, el crecimiento fetal excesivo, los nacimientos de fetos muertos; la hipoxia, el fallo respiratorio, problemas circulatorios, menor vigor post nacimiento, incremento de la temperatura corporal al nacimiento, malformaciones en el aparato urogenital (hidronefrosis, hipoplasia testicular), malformaciones en hígado y cerebro, disfunción inmunitaria, hipoplasia linfoide, anemia, atrofia de timo e infecciones bacterianas y víricas



## **VI.- Embrión y bioética.** El apartado último, lo vamos a dedicar a la **Ética de la vida.**

Es un tema consabido la manipulación de los datos científicos utilizando eufemismos. Por ejemplo, en la ley española de Reproducción Asistida Humana de 2006 (14/2006, de 26 de mayo) aparece 68 veces la palabra “preembrión”, que carece de significado científico, cuando en esa misma ley, en su primer artículo, se define que el preembrión es un embrión.

La bioética nace como consecuencia de una serie de acontecimientos (revolución médico-veterinaria; transformaciones tecnológicas; políticas sanitarias; principios de justicia, etc.), como reflexión sobre diferentes paradigmas: éticos, teológicos o deontológicos (principios universales, derechos humanos, ley natural, filosofía de Kant) y como consecuencia de principios, juicios morales, actitudes y conductas.

La ética civil o cívica es una ética de mínimos. Se basa en el mínimo de valores y normas que la sociedad moderna y democrática comparte, sean cuales sean sus creencias: religiosas, filosóficas, políticas o culturales. Tiene muchos puntos de vista sobre un mismo tema, no es laicista, ya que ésta rechaza las éticas religiosas, mientras que la cívica se puede servir de las éticas religiosas para sus valores mínimos.

Los **principios básicos de la bioética** son: no maleficencia (no hacer daño), beneficencia (hacer el bien), autonomía personal (respeto a las personas y a su intimidad) y justicia (que no sólo se aprovechen los de mayor capacidad económica).

A pesar de la claridad de estos cuatro principios, el tema del valor de la vida humana en sus inicios despierta posturas bien diversas, en cuanto al respeto que merece en los distintos estadios de su desarrollo. Por decirlo más claro: el punto de litigio estriba en el momento del proceso embrionario en que se decide otorgar, a la realidad humana embrionaria, la dignidad de persona, a sabiendas de que la noción de “persona” no es

un concepto científico sino filosófico, ético, religioso y jurídico. Por consiguiente la decisión de otorgar dignidad de persona a un estadio u otro del embrión no es fruto de una evidencia científica sino de una opción ética.

Hay quienes sostienen que el embrión humano no se puede considerar como una persona desde la fecundación, sino que llega a serlo en estadios posteriores del desarrollo embrionario y fetal: hacen depender la consideración ética del embrión de criterios biológicos. Sostienen que, en la etapa embrionaria, dentro de su continuidad y su *télos* interno, se pueden distinguir tres estadios importantes: primero, desde la fecundación a la implantación (dos primeras semanas); segundo, formación de la estructura inicial del sistema nervioso (hacia el día 18<sup>º</sup>); tercero, la finalización de la formación de los órganos (entre la 8<sup>a</sup> y la 10<sup>a</sup> semana) y basados en estos diversos estadios que se consideran cualitativamente diferentes, permiten otorgar al embrión humano una cualificación moral diferente a cada uno de ellos.

Entre quienes se basan en criterios relacionales o sociales para determinar la consideración ética del embrión humano, existen dos visiones diferentes. Para unos, el valor del embrión humano no está en el hecho de su hipotética dignidad intrínseca u ontológica, sino que es la intencionalidad de los padres, su deseo de tener un hijo, lo que da al embrión-feto su valor moral y su estatuto de persona en sentido social.

Para otros, la autoconciencia, la racionalidad y el sentido moral son tres condiciones básicas para ser considerado persona, cosa que, según ellos, no se puede decir ni del embrión (ya que se considera que no tiene conciencia) ni del feto (ya que se considera que tiene conciencia, pero no autoconciencia). Dentro de esta misma línea de pensamiento, hay quien añade que, para ser persona, además de las cualidades anteriores, también hay que tener sentido del pasado y del futuro, capacidad de relacionarse, comunicarse y respetar a los otros.

Desde el punto de vista jurídico, la protección del embrión humano se ha de analizar desde la protección de la vida humana y el reconocimiento que la ley le otorga. En este sentido, y en el contexto del territorio español, nos hemos de remitir forzosamente, en primer lugar, a la Constitución Española, que en su art. 15 afirma que *"todos tienen derecho a la vida..."*. Esta expresión ha sido interpretada en un sentido amplio, entendiendo que protege no sólo la vida del ya nacido sino también la vida del que



ha de nacer. No obstante, cuando al Tribunal Constitucional (TC) se le ha pedido opinión sobre esta cuestión (Sentencia 53/1985 en relación con el borrador de la Ley despenalizadora del aborto y Sentencia 116/1999 sobre la Ley de Reproducción Humana Asistida), se ha pronunciado en los siguientes términos:

*“La vida no es una realidad hasta el inicio de la gestación (implantación del embrión en el útero de la madre...)”,*

*“El nasciturus no es titular del derecho fundamental a la vida, aunque constituye un bien que ha de ser protegido...”*

*“Los embriones in vitro no pueden tener una protección equiparable a los embriones intra útero... la ley debe garantizar que ni los gametos ni los embriones puedan ser considerados jurídicamente como bienes comercializables.”*

Esta afirmación permite concluir que, para el TC, el embrión antes de su implantación tiene una consideración diferente a la del embrión implantado, que permite legitimar jurídicamente determinadas actuaciones sobre el mismo (reguladas por ley).

De esta interpretación jurisprudencial, se desprende la consideración de que el embrión humano, desde el inicio de formación del cigoto hasta su implantación en el útero materno, pasa diferentes fases, que pueden darse de forma natural o bien en el laboratorio, en las que la ley otorga diferentes grados de protección.

Actualmente, el marco jurídico viene definido por cuatro normas básicas: Código Penal (1996), Ley de Reproducción Humana Asistida (2006), y Ley de Investigación Biomédica (2007) y Ley Orgánica de salud sexual y reproductiva y de la interrupción voluntaria del embarazo (2010).

Consideran que hay suficientes argumentos desde el punto de vista biológico, ético y jurídico para afirmar que, al embrión humano, hay que otorgarle un valor diferenciado, distinguiendo entre la fase previa a la implantación y la fase posterior a la implantación, que lo hacen ponderable –en uno y otro momento– con otros valores que puedan concurrir con él. Ello no significa que no se le haya de otorgar protección.

Finalmente, los que afirman que el embrión humano ha de ser considerado como una persona desde el momento de la fecundación, apoyan su

opinión también en criterios biológicos. Subrayan que, desde la fecundación y hasta el nacimiento, el desarrollo embrionario y luego fetal es un *continuum* en el que no es posible señalar claramente líneas de demarcación.

Este criterio de la continuidad y de la finalidad interna (*télos*) de la realidad embrionaria es el que les permite asegurar que, desde la fecundación, estamos ante una persona humana, o bien, aplicando el beneficio de la duda, ante la probabilidad de que ese nuevo ser sea una persona. En ambos casos, se concluye que hay que respetar y tratar este nuevo ser como persona humana. En el primer caso, porque se afirma que lo es; en el segundo caso, porque, si no lo es, se le ha de otorgar el beneficio de la duda. Esta posición, basándose en el carácter sagrado de la vida humana desde la fecundación, insiste en que el embrión es humano porque posee el genoma humano completo. En cada momento de su desarrollo hay una estructura humana, y es esta unidad de todo el proceso la que le confiere su individualidad y su dignidad ontológica. Todas estas condiciones hacen que el embrión humano tenga que ser respetado y tratado como persona desde el momento de la fecundación y pertenezca de pleno derecho a la comunidad moral humana.

Esta postura, que es la de la Iglesia Católica, ha sido presentada en diversos documentos, siendo los más recientes: la encíclica *Evangelium Vitae* (1995) y la instrucción *Dignitas Personae* (2008).

Sea cual sea la postura ética, lo que está claro es que el embrión (en cualquier especie) es un ser vivo y, en la especie humana, biológicamente humano y tiene la capacidad de dar origen a una persona. El embrión es un ser vivo con vida propia, una realidad biológica irrepetible con un genotipo distinto al de la madre.

A lo largo de este documento, hemos abordado diferentes aspectos sobre evolución, genes organizadores del desarrollo, clonación, transgénesis, células totipotentes, ética, embrión, diagnóstico preimplantatorio, factores epigenéticos, etc., que nos llevan a plantearnos una serie de interrogantes como:

- ¿Por qué la naturaleza ha elegido en muchos casos la vía de la complejidad en el origen de organismos cada vez mas sofisticados, al menos en su organización, en contradicción con la segunda ley de la termodinámica?

- ¿Podremos en una próxima bocanada evolutiva laboratorial, duplicando ciertos genes HOX, por ejemplo, inducir cerebros supernumerarios, etc.?
- ¿Quién descubrirá (un biólogo o un matemático) cómo la naturaleza llega a realizar estructuras tridimensionales perfectamente idénticas por su tamaño y su forma, partiendo de una información lineal similar (el ADN de los gemelos) y a pesar de la presencia de sistemas intermedios altamente no lineales (los millones de células en interacción)?
- ¿Cómo un huevo fecundado, en el que se elimina el núcleo para reemplazarlo por otro (clonación), o cómo un embrión al que se le retira una célula en un estado en el que sólo tiene ocho (diagnóstico preimplantatorio) o al que se le añaden células totipotentes supernumerarias (transgénesis) y sobre el que se ejercen agresiones térmicas (congelación), mecánicas, hormonales,... llega, a pesar de todo, a finalizar un desarrollo normal? (¿pero estamos seguros a largo plazo de esta normalidad?).
- ¿Existe una programación epigenética en el útero o, en otras palabras, el medio maternal interviene en nuestro destino biológico?
- ¿El diagnóstico preimplantatorio es una puerta abierta a un nuevo eugenismo?



## VII.- Conclusión

Como acabamos de exponer en los diferentes apartados del documento, el embrión es un ser vivo, desde el momento de la fecundación, en todas las especies incluida la humana, obtenido *in vivo* como consecuencia de la reproducción normal o *in vitro* por biotecnología. Las relaciones que se establecen entre el embrión y la madre, demuestran la existencia de un diálogo entre ambos y el reconocimiento maternal del nuevo ser.

A través de los diferentes trabajos científicos realizados, podemos demostrar puntualmente las características biológicas del embrión desde el momento de la fecundación. Sin embargo, el concepto de persona no es un concepto científico. Esto significa que desde la estricta ciencia experimental no cabe decidir si una realidad biológica es o no persona. Como ya hemos dicho, el concepto de persona pertenece a la filosofía, la teología y la ética.

Por consiguiente, ya sea desde una postura ética o desde una actitud religiosa, sí que es posible optar o tomar la decisión de conceder u otorgar la dignidad de persona a la realidad biológica embrionaria humana. Obviamente, la etapa o el estadio del desarrollo embrionario al que se decide otorgar tal dignidad, variará según las diversas posturas éticas o religiosas. La postura de la Iglesia Católica es respetar la dignidad de persona desde el estadio de cigoto hasta el final natural de la vida humana, por la sencilla razón de que el proceso de desarrollo embrionario y crecimiento fetal, hasta el nacimiento, es un continuo.

Junto con esto, también debe quedar claro lo siguiente: la valoración moral de determinadas conductas se hace desde los principios éticos, o paradigma moral, de una determinada postura religiosa o ética. Sin embargo, este legítimo juicio ético sobre la conducta no debe confundirse con la valoración moral de la **decisión** que toma en conciencia quien actúa de uno u otro modo ante situaciones conflictivas. En este punto, también la Iglesia Católica ha mantenido desde siempre que el juicio sobre la conciencia sólo pertenece a Dios.

He dicho



## VIII.- Bibliografía

- Abe, Y., Hara, K., Matsumoto, H., Kobayashi, J., Sasada, H., Ekwall, H., Rodríguez-Martínez, H. and Sato, E.** (2005) Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol Reprod*, 72, 1416-1420.
- Aguilar, B., Vos, P.L.A.M., Beckers, J.F., Hensen, E.J., Dieleman, S.J.** The role of the major histocompatibility complex in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 1997, 47, 111-120.
- Amann RP and Almquist JO** 1957 Freezing bovine semen II. Effects of milk solid levels, glycerol levels and fructose on freezability of bull spermatozoa in reconstituted and fresh skim milk diluents. *Journal Dairy Science* 40 1542.
- Amoroso, E.C.** (1981). Viviparity, In: Glasser S.R., Bullock D.W. (Eds) Cellular and molecular aspects of implantation, Plenum Press, New York, pp.3-25
- Anthony, K.V., Helmer, S.D., Sharif, S.F., Roberts, R.M., Hansen, P.J., Thatcher, W.W., Bazer, F.W.** Synthesis and processing of ovine trophoblast protein-1, conceptus secretory proteins involved in the maternal recognition of pregnancy. *Endocrinology*, 1988, 123: 3, 1274-1280.
- Aschheim, S. and Zondek, B.** (1927), Hypophysenvorderlappen-hormon und Ovarialhormon in Harn von Schwangeren. *Klin. Wschr.* 6: 1322.
- Ashworth, CH.J.** (1992). Synchrony embryo-uterus. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 259-267.
- Bartol, F.F., Thatcher, W.W., Bazer, f.W., Kimball, F.A., Chenault, J.R., Wilcox, C.J., Roberts, R.M.** (1981). Effects of the estrous cycle and early pregnancy on bovine uterine, luteal and follicular responses. *Biol. Reprod.* 25: 759-776.
- Bastero, J.J.** (2010) Comunicación personal.
- Basu, S. and Kindahl, H.** Prostaglandin biosynthesis and its regulation in the bovine endometrium: A comparison between non pregnant and pregnant status. *Theriogenology*, 1987, 28, 175-193.
- Basu, S.** Maternal recognition of pregnancy. A review of the literature. *Nordisk Veterinaermedicin*, 1985, 37: 2, 57-79.

- Battista, P.J., Alila, H.W., Rexroad, C.E., Jr., Hansel, W.** (1989). The effects of platelet-activating factor and platelet-derived compounds on bovine luteal cell progesterone production. *Biology of Reproduction*. 40: 4, 769-775.
- Bazer, F.W.** (1989). Establishment of pregnancy in sheep and pigs. *Reprod. Fertl. Dev.*, 1: 237-242.
- Bazer, F.W.** Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *Proc. of Soc. for Exp. Biol. and Med.*, 1992, 199: 4, 373-384.
- Bazer, F.W., Johnson, H.M.** Type I conceptus interferons: maternal recognition of pregnancy signals and potential therapeutic agents. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1991, 26: 1, 19-22.
- Bazer, F.W., Ott, T.L., Spencer, T.E., Armstrong, D.T.** Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: signals from the trophoblast. *Theriogenology*, 1994, 41: 1, 79-94.
- Bazer, F.W., Thatcher, W.W., Hansen, P.J., Mirando, M.A., Ott, T.L., and Plante, C.** (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. *J. Reprod. Fertl (Suppl)* 43: 39-47.
- Bazer, F.W., Vallet, J.L. Harney, J.P., Gross, T.S., Thatcher, W.W.** (1989). Comparative aspects of maternal recognition of pregnancy between sheep and pigs. *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 37, 85-89.
- Bazer, F.W., Vallet, J.L., Roberts, R.M., Sharp, D.C., Thatcher, W.W.** Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journal of Reprod. and Fertl.*, 1986, 76: 2, 841-850.
- Bedford, J. M.** (1998) Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod*, 59, 1275-1287.
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A. and Keefer, C.L.** (2003) Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*, 59, 1839-1850.
- Betteridge, K.J. and Mitchel, D.** (1974). Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J. Reprod. Fertl.* 39: 145-148.
- Blackshaw AW and Emmers CW** 1953 Survival of deep-frozen mammalian spermatozoa. *Vet.Rec.* 65 872.
- Blair, R.M., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Yellin, T., Fulton, R.W. and Short, E.C.,** (1991). Endometrial surface and secretory alterations associated with embryonic mortality in gilts administered estradiol valerate on days 9 and 10 of gestation. *Biol. Reprod.* 44: 1063-1079.
- Blondin P., Sirad M.A.:** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 1995; 41: 54-62.
- Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Rosati, I., Zedda, M. T., Leoni, G., Succu, S., Pau, S. and Ledda, S.** (2007) Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, 68, 1138-1149.
- Boice, M.L., McCarthy, T.J., Mavrogianis, P.A., Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G.,** (1990). Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio Anubis*). *Biol. Reprod.* 43:340-346.



- Bondioli, K.R. and Wright, R.W., Jr.** (1983) In vitro fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. *J Anim Sci*, 57, 1006-1012.
- Boukhari, S.** (1999). De la iglesia Católica al Budismo, pasando por el Islam, el Judaísmo y el Protestantismo, <http://unesco.org.courier>
- Butler, J.E., Hamilton, W.C., Sasser, R.G., Ruder, C.A., Hass, G.M., and Willians, J.J.** Detection and partial characterization of two bovine pregnancy specific protein. *Biol. Reprod.*, 1982, 26, 925-933.
- Cano Torres, R.,** (2009), Vitricación de ovocitos (inmaduros y maduros) y embriones ovinos producidos in vitro: comparación de las técnicas OPS y OPS modificada (mOPS). Tesis Doctoral. (226 pp), Universidad de Zaragoza (España).
- Catt, J.W. and Rhodes, S.L.** (1995) Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev*, 7, 161-166; discussion 167.
- Catt, S.L., Catt, J.W., Gomez, M.C., Maxwell, W.M. and Evans, G.** (1996) Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec*, 139, 494-495.
- Cetica, P.D., Dalvit, G.C. and Beconi, M.T.** (1999) Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. *Biocell*, 23, 125-133.
- Checura, C.M. and Seidel, G.E., Jr.** (2007) Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*, 67, 919-930.
- Chen, S.U., Lien, Y.R., Cheng, Y.Y., Chen, H.F., Ho, H.N. and Yang, Y.S.** (2001) Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod*, 16, 2350-2356.
- Chian, R.C., Kuwayama, M., Tan, L., Tan, J., Kato, O. and Nagai, T.** (2004) High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev*, 50, 685-696.
- Cho, S.K., Cho, S.G., Bae, I.H., Park, C.S. and Kong, I.K.** (2002) Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci*, 73, 151-158.
- Clarke, R.N., Rexroad, C.E., Powell, A.M. and Johnson, L.A.** (1988) Microinjection of ram spermatozoa into homologous and heterologous oocytes. *Biol Reprod*, 38, 75.
- Collier, M., O'Neil, C., Ammit, A.J. and Saunders, D.M.** (1988). Biochemical and pharmacological characterization of human embryo-derived platelet activating factor. *Hum. Reprod.* 3: 993-998.
- Congregación para la Doctrina de la Fe** (2008) Instrucción *Dignitas personae* sobre algunas cuestiones de bioética.
- Coticchio, G., Bonu, M.A., Borini, A. and Flamigni, C.** (2004) Oocyte cryopreservation: a biological perspective. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 115 Suppl 1, S2-7.
- Cremades, N., Sousa, M., Silva, J., Viana, P., Sousa, S., Oliveira, C., Teixeira da Silva, J. and Barros, A.** (2004) Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod*, 19, 300-305.
- Crosby, I.M., Gandolfi, F. and Moor, R.M.** (1988). Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 82: 769-775.

- Crozet, N., Huneau, D., Desmedt, V., Theron, M. C., Szollosi, D., Torres, S. and Sevellec, C. (1987)** In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res*, 16, 159-170.
- Cuello, C., Berthelot, F., Delaleu, B., Venturi, E., Pastor, L.M., Vázquez, J.M., Roca, J., Martinat-Botte, F. and Martínez, E.A. (2007a)**. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocysts: an ultrastructural and cell death study. *Theriogenology*, 67, 970-982.
- Cuello, C., Berthelot, F., Martinat-Botte, F., Venturi, E., Guillouet, P., Vázquez, J.M., Roca, J. and Martínez, E.A. (2005)** Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Anim Reprod Sci*, 85, 275-286.
- Cuello, C., Gil, M.A., Alminana, C., Sánchez-Osorio, J., Parrilla, I., Caballero, I., Vázquez, J.M., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H. and Martínez, E.A. (2007b)** Vitrification of in vitro cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology*, 68, 258-264.
- Cuello, C., Gil, M.A., Parrilla, I., Tornel, J., Vázquez, J. M., Roca, J., Berthelot, F., Martinat-Botte, F. and Martínez, E.A. (2004)** Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology*, 62, 353-361.
- Cuello, C., Sánchez-Osorio, J., Alminana, C., Gil, M.A., Peral, M.L., Lucas, X., Roca, J., Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. (2008)** Effect of the cryoprotectant concentration on the in vitro embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Cryobiology*, 56, 189-194.
- Curl, J.S.** Uterine lipid composition and endometrial prostaglandin synthesis and transport in relationship to maternal recognition of pregnancy and luteolysis in the bovine. *Dissertation Abstracts Int., B.*, 1989, 50: 1, 77.
- Devroey, P. and Van Steirteghem, A. (2004)**. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update*, 10, 19-28.
- Díez, C., Duque, P., Gómez, E., Hidalgo, C.O., Tamargo, C., Rodríguez, A., Fernández, L., de la Varga, S., Fernández, A., Facal, N. and Carbajo, M. (2005)** Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, 64, 317-333.
- Dunbar, M.M., Wong, T.S., Ruder-Montgomery, C.A., Chew, B.P., and Sasser, R.G.** Partial characterization of the immuno-suppressive properties of pregnancy specific protein B (PSPB). *Theriogenology.*, 1990, 33, Abs. 220.
- Dziuk, P.J. (1992)**. Embryonic development and fetal growth. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 299-308.
- Espinosa, E. (1993)**. Fisiopatología de las relaciones entre la madre y el complejo embrionario-fetal. 5º Simp. Int. Repr. Anim. Vol. I: 34-73.
- Espinosa, E. (1996)**. Biotecnología reproductiva aplicada a la producción del ovino y caprino. Libro sobre Sanidad y Producción de Rumiantes en el Área del Mediterraneo., 17-48.
- Espinosa, E. (1997)**. Immunological events during preimplantation in the cow. *Iberian Congress of Animal Reproduction*. Vol. 1, 133-140.
- Espinosa, E. (1997)**. Maternal recognition of pregnancy in the cow. *Iberian Congress of Animal Reproduction*. vol. 1, 13-41

- Espinosa, E.** (1997). Técnicas reproductivas y control de la reproducción en ovinos. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Año IV, nº 2, 36-45.
- Espinosa, E.** (2000) Biotecnologías reproductivas aplicadas a la producción ovina y caprina. *Archivos de Reproducción Animal*, vol. 11, 58-72.
- Espinosa, E.** –Reconocimiento maternal de la gestación.– *Proced. of the 7th Int. Meet. on Anim. Reprod.*, pp: 1-15, 1994.
- Espinosa, E.** –Técnicas reproductivas y control de la reproducción ovina.– *Congreso Fe.Me.S.P.Rum.* pp: 263-277, 1992.
- Espinosa, E., Josa, A., Martí, J.I., Gil, L.** (2005) Triploidy in rainbow trout determined by computer-assisted análisis, *Journal of Experimental Zoology* vol. 303: 12, 1007-1012.
- Espinosa, E., Josa, A., Mitjana, O., Llado, E., Gil, L., Echegaray, A.** (1999) Control de sexo y producción de triploides en trucha Arco Iris (*Onchorrhynchus Mykiss*). *Congreso Ibérico de Reproducción Animal Libro Ponencias y Comunicaciones* 158-161.
- Farin, C.E., Imakawa, K., Hansen, T.R., McDonnell, J.J., Murphy, C.N., Farin, P.W., Roberts, R.M.** Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Biology of Reprod.* 1990, 43:2, 210-218.
- Fillion, C., Chaouat, G., Charpigny, G., Reinaud, P., Martal, J.** (1990). Immunoregulatory effects of trophoblastin (oTP): all 5 isoforms are immunosuppressive of PHA driven lymphocyte proliferation. *J. Reprod. Immunol*, 19, pp. 237-249
- Findlay, J.K., Ackland, N., Burton, R.D., Davis, A.J., Maule-Walker, F.M., Walters, O, Heap, R.B.** (1981). Protein, prostaglandin and steroid synthesis in caruncular and intercaruncular endometrium of sheep before implantation. *J. Reprod. Fertil.* 62: 361-377.
- First, N.L., Eyestone, W.H.** (1988). Reproductive efficiency in domestic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541, 697-705.
- Fisher, S.J., Giménez, T., and Henricks, D.M.** Immunosuppressive activity associated with early pregnancy in the bovine. *Biol. Reprod.*, 1985, 32, 894-906.
- Flint, A.P.F., Hearn, J.P., Michael, A.E.** (1990). The maternal recognition of pregnancy in mammals. *Journal of Zoology*, 221: 2, 327-341.
- Flint, A.P.F., Parkinson, T.J., Stewart, H.J., Vallet, J.L., Lamming, G.E.** Molecular biology of trophoblast interferons and studies of their effects in vivo. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1991, Suppl. 43, 13-25.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, W.L., Jones, D.S.C., Auletta, F.J.** (1989). Adaptations to pregnancy in the interactions between luteal oxytocin and the uterus in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility. Suppl.* 37, 195-204.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L.** Ovarian oxytocin and the maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1986, 76:2, 831-839.
- Foot R.H.**, 1964 Extenders for Freezing Dog Semen. *American Journal of Veterinary Research* 25 37-40.
- Ford, S.P.**, Maternal recognition of pregnancy in the ewe, cow, and sow: vascular and immunological aspects. *Theriogenology*, 1985, 23: 1, 145-159.
- Francis, H., Keisler, D.H., Roberts, R.M.** Induction of the synthesis of the pregnancy specific protein p70 in the endometrium by intramuscular injection of recombinant bovine interferon alfa-1 in non pregnant ewes. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1991, 93:2, 367-374.

- Fraser A.F.**, 1962. A Technique for Freezing Goat Semen and Results of a Small Breeding Trial. *The Canadian Veterinary Journal*, 3 133-144.
- Freund M and Wiederman J.** 1963 Controlling and recording rates of freezing and defrosting of human semen. *Journal of Applied Physiology* 18 407-409.
- Fukuda Y., Ennari N.** "Developmental ability of *in vitro* matured- *in vitro* fertilized bovine embryos derived from oocytes with homogeneous or heterogeneous ooplasm" *Proc. 7<sup>th</sup> World Conf. on Anim. Prod.* 1993, 2: 276- 277.
- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Modina, S., Passoni, L.** (1992). Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 269-276.
- Gandolfi, F., Modina, S., Brevini, T.A.L., Galli, C., Moor, R.M. and Lauria, A.** (1991). Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur. J. Bas. Appl. Histochem.* 35: 383-392.
- Gandolfi, F., Van Eijk, M.J.T., Modina, S., Scesi, L., Lewin, H.A., Mummery, C.L.** Expression of Oct-4 transcription factor in bovine oocytes and embryos. *Theriogenology*, 1997, 47, Abstract 213.
- García-García, R.M., Ward, F., Fair, S., O'Meara, C.M., Wade, M., Duffy, P. and Lonergan, P.** (2007) Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Anim Reprod Sci*, 98, 233-240.
- Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A. and Batt, P.A.** (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod*, 50, 390-400.
- Gardner, H.G. and Kaye, P.L.** (1991). Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 79-91.
- Geisert, R.D., Morgan, G.L., Short, E.C., Zavy, M.T.** Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod. Fertil. and Devolp.*, 1992, 4, 301-305.
- Geisert, R.D., Renegar, R.H., Thatcher, W.W., Roberts, R.M., Bazer F.W.,** (1982). Establishment of pregnancy in the pig: 1. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. *Biol. Reprod.* 27: 925-939.
- Geisert, R.D., Short, E.C., Zavy, M.T.** (1992). Maternal recognition of pregnancy. *Anim Reprod. Sci*, 28: 287-298.
- Geisert, R.D., Zavy, M.T., Moffatt, R.J., Blair, R.M., Yellin, T.** (1990). Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility. Suppl.* 40, 293-305.
- Godkin, J.D., Bazer, F.W., Thatcher, W.W. and Roberts, R.M.** (1984). Proteins released by cultured day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. *J. Reprod. Fertil.* 71: 57-64.
- Goff, A.K., Pontbriand, D., and Sirois, J.** (1987). Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F2alpha during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *Journal of Reproduction and Fertil. Suppl.* 35, 253-260.
- Goff, A.K., Sirois, J. and Pontbriand, D.,** (1991). Are estrogens luteotrophic or luteolytic in the mare? *Biol. Reprod.* 44 Suppl. 1: 164 (Abstract)

- González, N.** (2003) Producción de embriones bovinos a partir de ovarios de matadero: medios, sistemas de incubación y preservación. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.
- Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. and Ogawa, K.** (1990) Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Rec*, 127, 517-520.
- Gries, L.K., Geisert, R.D. Zavy, M.T., Garrett, J.E. and Morgan, G.L.** (1989). Uterine secretory alterations coincident with embryonic mortality in the gilt after exogenous estrogen administration. *J. Animal. Sci.* 67, 276-284.
- Gross, T.S., Thatcher, W.W., O'Neill, C., and Danet-Desnoyers G.,** Platelet Activating Factor alter the dynamics of prostaglandin and protein synthesis by endometrial explants from pregnant and cyclic cows at day 17 following oestrus. *Theriogenology*, 1990, 34, 205-218.
- Grupo Interdisciplinario en Bioética.** Consideraciones sobre el embrión humano. *Bioética and Debat*, vol. 15, núm. 57, 2009
- Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Girish Kumar, V., Raghu, H.M. and Nandi, S.** (2005) Stimulation of *in vitro* ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Ruminant Research*, 59, 33-40.
- Hanahan, D.J.** (1986). Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 483-509.
- Hansel, W., Stock, A., Battista, P.J.** (1989). Low molecular weight lipid-soluble luteotrophic factor(s) produced by conceptuses in cows. *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 37, 11-17.
- Hansen, P.J.** Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology*, 1997, 47, 121-130.
- Hansen, P.J.** Rescue of the corpus luteum from luteolysis by bovine trophoblast protein-1: an example of maternal recognition of pregnancy. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 1991, Nº 3 suppl., 42-65.
- Harney, J.P., Miranda, M.A., Smith L.C. and Bazer, F.W.** (1990). Retinol-binding proteins: A major secretory product of the pig conceptus. *Biol. Reprod.* 42: 523-532.
- Harvey, M.B. and Kaye, P.L.** (1991). Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-I through the insulin receptor. *Mol. Reprod. Dev.* 29: 253-258.
- Hawk H. W., Wall R.J.** Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 1994, 41: 1571-1583.
- Hazeleger N.L., Stubbings R.B.:** Development potential of selected bovine oocyte 1992, 37 (1): cumulus complexes *Theriogenology* 219.
- Heap, R.B., Davis, A.J., Fleet, I.R., Goode, J.A., Hamon, M., Nowak, R.A., Stewart, H.J., Whyte, A., Flint, A.P.F.** (1988). Maternal recognition of pregnancy. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Volume 5, 55-60.
- Heap, R.B., Whyte, A., Salamonsen, L., Wang, MW.** (1989). Comparative studies on the maternal recognition of pregnancy. *Equine Veterinary Journal, Suppl.* 8, 1-6.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S. and Fernández, M.** (2007) Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 15.

**Heyman, Y., Camous, S., Fevre, J., Meziou, W., Martal J.** Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblast vesicles to cyclic cows and ewes. *J. Reprod. Fert.* 1984, 70, 533-540.

**Hiramoto, Y.** (1962) Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res*, 27, 416-426.

**Hochi, S., Akiyama, M., Kimura, K. and Hanada, A.** (2000) Vitrification of in vitro matured bovine oocytes in open pulled glass capillaries of different diameters. *Theriogenology*, 53, 255.

**Hochi, S., Ito, K., Hirabayashi, M., Ueda, M., Kimura, K. and Hanada, A.** (1998) Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology*, 49, 787-796.

**Hochi, S., Semple, E. and Leibo, S. P.** (1996) Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46, 837-847.

**Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M. and Hirao, M.** (2004) Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology*, 61, 267-275.

**Hodgen, G.D., Itskowitz, J.** (1988). Recognition and maintenance of pregnancy. In *Physiology of Reproduction*, pp 1995-2021.

**Hong, S.W., Chung, H.M., Lim, J.M., Ko, J.J., Yoon, T.K., Yee, B. and Cha, K.Y.** (1999) Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril*, 72, 142-146.

**Humbolt, P.** (1991). Embryonic signals and pregnancy diagnosis in ruminants. *Recueil de Medecine Veterinaire*. 167: 3-4, 193-202.

**Ito, K., Otake, S., Hirabayashi, M., Hochi, S. and Ueda, M.** (1998) Cryopreservation of in vitro-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. *Theriogenology*, 50, 1093-1100.

**Joosten, I., Sanders, M.F., Hensen, E.J.** Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. *Anim. Genet.* 1991, 22, 455-463.

**Juan Pablo II** (1995) Carta encíclica *Evangelium vitae* sobre el valor y el carácter inviolable de la vida humana.

**Kan, F.W.K., St-Jacques, S. and Bleau, G.** (1989). Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biol. Reprod.* 40: 585-598.

**Kapur, R.P. and Johnson, L.V.** (1988). Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat. Rec.* 221: 720-729.

**Keskintepe, L. and Brackett, B.G.** (2000) Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53, 1041-1052.

**Knickerbocker, J.J., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Barron, D.H., Roberts, R.M.** Inhibition of uterine prostaglandin F2 $\alpha$  production by bovine conceptus secretory proteins. *Prostaglandins*, 1986, 31: 4, 777-793.

- Knickerbocker, J.J., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Drost, M., Baron, D.H., Fincher, K.B., and Roberts, R.M.** Protein secreted by Day 16 to 18 bovine conceptuses extend corpus luteum function. *J. Reprod. Fert.* 1986, 77, 381-391.
- Kong, I.K., Lee, S. I., Cho, S.G., Cho, S.K. and Park, C.S.** (2000) Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, 53, 1817-1826.
- La Bonnardiere, C., Martal, J.** (1991). Les interférons embryonnaires. *Le Point vétérinaire*, 23, n° 138 pp. 55-61
- Le Gal, F. and Massip, A.** (1999) Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology*, 38, 290-300.
- Leifried M.L., First N.L.:** "Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*" *Journal of Animal Science* 1979, 48: 76- 86.
- Leibo, S.P. and Songsasen, N.** (2002) Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57, 303-326.
- Leibo, S.P., Martino, A., Kobayashi, S. and Pollard, W.** (1996) Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim Reprod Sci*, 42, 45-53.
- Lewis, G.S.** (1989), Prostaglandin secretion by the blastocyst. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 37, 261-267.
- Liebermann, J. and Tucker, M.J.** (2002) Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, 124, 483-489.
- Lj, X., Su, L., Li, Y., Ji, W. and Dinnyes, A.** (2002) Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology*, 58, 1253-1260.
- Luvoni, G.C. and Chigioni, S.** (2006) Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. *Theriogenology*, 66, 1471-1475.
- Malo, C.M.**, 2009. Diseño de diluyentes de congelación de semen porcino. Tesis Doctoral, 172 pp, Universidad de Zaragoza (España)
- Mann, G.E., Lamming, G.E., Fray, M.D.** Plasma estradiol during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim. Reprod. Sci.*, 1995, 37, 121-131.
- Mantegazza, P.**, Sullo sperma umano. *Rec. Inst. Lomb. Sci. Lett.*, 13 183-196, 1866.
- Martal, J.** –L'embryon chez l'homme et l'animale.– INRA-INSERM., 2002
- Martal, J.** –Les biotechnologies de la reproduction animale.– (Biotechnologie, 4<sup>e</sup> edit. Scriban, R.), pp: 589-649. 1993
- Martal, J., Assal, A., Assal, E., Charlier, M., Chêne, N., Charpingny, G., Guillomot, M., Chaouat, G.** (1991), Characterization, antiluteolytic and immunosuppressive effects of ovine trophoblastin (oTP, a.- interferon if class "III"). Dans "Cellular and molecular biology of the materno-fetal relationship, 212 pp. 317-324 G. Chaouat, J. Mowbray (eds). Colloque Inserm/John Libbey Eurotext Ltd.
- Martal, J., Assal, E., Zouari, K., Huynh, L., Chêne, N., Reinaud, P., Charpigny, G., Charlier, M.** (1992). Fonction endocrine des interférons embryonnaires. 8<sup>e</sup> Rem. A.E.T.E. pp 67-77
- Martal, J., Charlier, M.** Avortements précoces et signaux embryonnaires de reconnaissance de la gestation. *Recueil de Med. Vet.*, 1985, 161: 2, 87-97.

- Martal, J., Charlier, M., Camous, S., Fevre, J., Heyman, Y.** Origin of embryonic signals allowing the establishment of pregnancy corpus luteum in ruminants. 10th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A.I., 1984, vol. III., paper 509.
- Martal, J., Charlier, M., Charpigny, G., Camous, S., Chêne, N., Renaud, P., Sade, S., and Guillomot, M.** (1987). Interference of trophoblastin in Ruminant embryonic mortality. A review. *Livestock Prod. Sci.* 17: 193-210.
- Martal, J., Chêne, N.** (1992). Functions of embryonic interferons and of the main serum proteins specific for pregnancy, *Trophoblast Research*, 6: 73-122.
- Martal, J., Chêne, N., Charlier, M., Charpigny, G., Camous, S., Guillomot, M., Renaud, P., Berton, J., and Humblot, P.** Proteines Trophoblastiques. *Reprod. Nutr. Develop.* 1988, 28, 1655-1672.
- Martal, J., Chene, N.,** Functions of embrionic interferons and of the main serum proteins specific for pregnancy. *Troph. Res.*, 6, pp: 73-122, 1992.
- Martal, J., Lacroix, M.C., Loudes, C., Saunier, M.,** Winterberger-Torres Trophoblastin and antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1979, 56, 63-73.
- Martus, N.S., Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A., Thibodeaux, J.K.** Enhanced in vitro development of bovine embryos in the presence of a bovine oviductal specific glycoprotein. *Theriogenology*, 1997, 47, Abstract 334.
- Matsumoto, H., Jiang, J. Y., Tanaka, T., Sasada, H. and Sato, E.** (2001) Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42, 139-144.
- Mayes M.A., Sirard A.:** "The influence of cumulus- oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle" *Theriogenology* 2001, 55: 911- 922.
- McDowell, K.J., Sharp, D.C., Grubaugh, W., Thatcher, W.W., Wilcox, C.J.** (1988). Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biology of Reproduction.*, 39: 2, 340-348.
- Merk H. and Krause D.,**1966, Deep-freezing of ass and stallion semen in concentrated pellet form. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 73, 267-268.
- Meulen, J vand der., Helmond, F.A., Oudenaarden, C.P.J.,** (1988). Determination of the time period in which the maternal recognition of pregnancy in the pig takes place. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Volume 2, Paper n° 106.
- Modina, S., Milanese, E., Baraldi-Scesi, L., Brevini, T.A.L., Acocella, F., Lauria, A., Armstrong, D.T., Gandolfi, F.** Comparison of the oviductal secretions of prepuberal and adult cows. *Theriogenology*, 1997, 47, Abstract 335.
- Moor R.M., Trounson A.O.:** Hormonal and follicular factors affecting maturation on sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity *Journal of Reproduction and Fertility* 1997; 49: 101- 109.
- Mortimer, S.T.** (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*, 3, 403-439.
- Moussa, M., Bersinger, I., Doligez, P., Guignot, F., Duchamp, G., Vidament, M., Mermilod, P. and Bruyas, J.F.** (2005) In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for



- equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 64, 1619-1632.
- Muenthaïsong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., Parnpai, R. and Hochi, S.** (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology*, 67, 893-900.
- Nagano M., Takahashi Y., Katagiris:** *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J. Vet. Med Sci* 1999, 61: 531- 535.
- Naik, B. R., Rao, B. S., Vagdevi, R., Gnanprakash, M., Amarnath, D. and Rao, V. H.** (2005) Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci*, 86, 329-338.
- Niswender, G.D., Nett.** (1988). The corpus luteum and its control. In: Knobil E., Neill J. Eds., *The physiology of reproduction*, Raven Press. New-York, pp 486-526.
- O'Neill, C.** Embryo-derived platelet activating factor. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1992, 4, 283-288.
- O'Neill, C., Collier, M., Ryan J.P., Spinks, N.R.** (1989). Embryo derived platelet activating factor. *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 37, 19-27.
- Orozco, C., Perkins, T. and Clarke, F.M.** (1986). Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor in female mice. *J. Reprod. Fertil.* 78: 549-555.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C.** (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-18.
- Palma, G.A.,** (2008). *Biología de la reproducción: Ciencia, tecnología y sociedad.*
- Papis, K., Shimizu, M. and Izaïke, Y.** (2000) Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 54, 651-658.
- Paría, B.C. and Dey, S.K.** (1990). Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4746-4760.
- Parkinson, T.J.** Bovine embryonic mortality and the maternal recognition of pregnancy. *Veterinary Annual*, 1992, 32, 29-46.
- Parkinson, T.J., Lamming, G.E., Flint, A.P.F., Jenner, L.J.** Administration of recombinant bovine interferon tau at the time of maternal recognition of pregnancy inhibits prostaglandin F<sub>2α</sub> secretion and causes luteal maintenance in cyclic ewes. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1992, 94: 2, 489-500.
- Pérez F., Pérez JF.,** El ambiente uterino y su relación con el éxito procreativo. *GAP Junctions., O Médico Veterinario* 65, 8-29 (2001).
- Pérez Pérez F., Pérez Gutiérrez JF., Córdova Izquierdo A.** Inicio, presente y futuro de la clonación. *Biologías aplicadas a la reproducción animal.* Editorial Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México (2005).
- Pérez y Pérez F., Pérez Gutiérrez JF.** La placenta en los mamíferos. Editorial Díaz de Santos, (1993).
- Pérez y Pérez F., Pérez Gutiérrez JF.,** *Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones.* Editorial Científico Médica, Barcelona. (1985).

- Pérez y Pérez F., Pérez-Gutiérrez JF.**, La fecundación in vitro y el transplante de embriones., *O Médico Veterinario* 94, 12-17 (2008).
- Pérez y Pérez F., Pérez-Gutiérrez JF.**, La inseminación artificial, biotecnología de máxima rentabilidad en la mejora ganadera y producción de alimentos para el hombre. Conceptos y problemas que plantea su aplicación en la especie humana. *O Médico Veterinario* 93, 23-29 (2007).
- Platz, C.C., Wildt, D.E. and Seager, S.W.** 1987. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 52 279-282.
- Pornwiroon, S., Kunathikom, S., Makemaharn, O. and Huanaraj, R.** (2006) Vitrification of mouse oocyte using open pulled straws compared with needles. *J Med Assoc Thai*, 89, 2015-2020.
- Poyad, J.W. and Leibo, S.P.** (1994) Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41, 101-106.
- PURSEL, V.G. AND JOHNSON, L.A.** 1975, Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science* 40 99-102.
- Rajnachapel-Messai, J.** When embryos produce interferons. *Biofutur*, 1992, 109, 30-33.
- Ramezani, M., Valojerdi, M.R. and Parivar, K.** (2005) Effect of three vitrification methods on development of two-cell mouse embryos: *Cryo Letters*, 26, 85-92.
- Roberts, R.M.** (1989). Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction*, 40: 3, 449-452.
- Roberts, R.M., Cross, J.C., Leaman, D.W.** Interferons as hormones of pregnancy. *Endocrine Rev.*, 1992, 13, 432-452.
- Roberts, R.M., Farin, C.E., Cross, J.C.** (1990) Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 12, 147-180.
- Roberts, R.M., Klemen, S.W., Leaman, D.W., Bixby, J.A., Cross, J.C., Farin N, C.E., Imakawa, K., Hansen N, T.R.** The polypeptides and genes for ovine and bovine trophoblast protein-1. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1991, suppl. 43, 3-12.
- Roberts, R.M., Leaman, D.W., Cross, J.C.** (1992). Role of interferon in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200: 1, 7-18.
- Roberts, R.M., Schalue-Francis, T., Francis, H., Keisler, D.** Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. *Theriogenology*, 1990, 33: 1, 175-183.
- Roberts, R.M., Xie, S., and Mathialagan, N.** Maternal Recognition of Pregnancy *Biology of Reprod.* 1996, 54, 294-302.
- Rodríguez-Dorta, N., Cognie, Y., González, F., Poulin, N., Guignot, F., Touze, J. L., Baril, G., Cabrera, F., Alamo, D., Batista, M., Gracia, A. and Mermillod, P.** (2007) Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 68, 908-913.
- Sánchez-Osorio, J., Cuello, C., Gil, M.A., Alminana, C., Parrilla, I., Caballero, I., García, E.M., Vázquez, J.M., Roca, J. and Martínez, E.A.** (2008) Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. *Anim Reprod Sci*, 108, 334-344.

- Schenker, J.G.,** (2005). Assisted reproductive practice: religious perspectives. *Reprod. Biomed. Online*, 10, 310-319.
- Schmidt, H. and Kamp, G.** (2004) Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*, 128, 171-179.
- Seki, S. and Mazur, P.** (2008) Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biol Reprod*, 79, 727-737.
- Sergeev, N.I., Nekrasov, A.A., Smyslova, N.I.** Endocrine aspects of the maternal recognition of pregnancy in relation to the acceptance of transplanted embryos. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 1986, 3, 11-18.
- Sharp, D.C., Dowell, J. Mc, Weithenauer, J., and Thatcher, W.W.** (1989). The continuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 37: 101-107.
- Sharp, D.C., McDowell, K.J., Weithenauer, J., Franklin, K., Mirando, M., Bazer, F.W.** (1989). Is an interferon-like protein involved in the maternal recognition of pregnancy in mares? *Equine Veterinary Journal*, Supplement 8, 7-9.
- Sharp, D.C., McDowell, K.J., Weithenauer, J., Thatcher, W.W.** (1989). The cotinuum of events leading to maternal recognition of pregnancy in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 37, 101-107.
- Shaw, J. M., Oranratnachai, A. and Trounson, A. O.** (2000) Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53, 59-72.
- Short, E.C. Jr., Geisert, R.D., Helmer, S.D., Zavy, M.T., Fulton, R.W.** Expression of antiviral acvtivity and induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase by conceptus secretory proteins enriched in bovine trophoblast protein-1. *Biology Reprod.* 1991, 44:2, 261-268.
- Singh, B., Barbe, G.J. and Armstrong, D.T.** (1993) Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Mol Reprod Dev*, 36, 113-119.
- Smith, A.U. and Polge, C.,** 1950 Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature* 166 668-669.
- Stewart, H.J., Guesdon, F.M.J., Paine, J.H., Charleston, B., Vallet, J.L., Flint, A.P.F., Brooks, N., Challis, J., McNeilly, A., DoberskaA, C.** Trophoblast interferons in early pregnancy of domestic ruminants. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1992, Suppl. 45, 59-68.
- Sueoka, K., Dharmarajan, A.M., Miyazaky, T., Atlas, S.J. and Wallach, E.E.** (1988b). Platelet activating factor-induced early pregnancy factor activity from the perfused rabbit ovary and oviduc. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159: 1580-1584.
- Swain, J.E., Bormann, C.L. and Krisher, R.L.** (2001) Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. *Theriogenology*, 56, 459-469.
- Szollosi, D., Desmedt, V., Crozet, N. and Brender, C.** (1988) In vitro maturation of sheep ovarian oocytes. *Reprod Nutr Dev*, 28, 1047-1080.
- Tarin, J.J. and Trounson, A.O.** (1994) Inducers of the acrosome reaction. *Reprod Fertil Dev*, 6, 33-35; discussion 35-36.
- Tesarik, J., Mendoza, C. and Testart, J.** (1995) Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med*, 333, 525.

**Tesarik, J., Rolet, F., Brami, C., Sedbon, E., Thorel, J., Tibi, C. and Thebault, A.** (1996) Spermatozoid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 11, 780-783.

**Thatcher, W.W., Macmillan, K.L., Hansen, P.J., Drost, M.** (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, 31: 1, 149-164.

**Thatcher, W.W., Bartol, F.K., Knickerbocker, J.J., Curl, J.S., Wolfenson, D.** Maternal recognition of pregnancy in cattle *J. Dairy Sci.*, 1984, 67, 2797-2811.

**Thatcher, W.W., Binelli, M., Burke, J., Staples, C.R., Ambrose, J.D., Coelho, S.** Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology*, 1997, 47, 131-140.

**Thatcher, W.W., Danet-Desnoyers G., Wtzels, C.** Regulation of bovine endometrial prostaglandin secretion and the role of bovine trophoblast protein-1 complex. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1992, 4, 329-334.

**Thatcher, W.W., Hansen EN, P.J., Gross, T.S., Helmer, S.D., Plante, C., Bazer, F.W.** Antiluteolytic effects of bovine trophoblast protein-1. *Journal of Reprod. and Fertil.*, 1989, Suppl. 37, 91-99.

**Thatcher, W.W., Knickerbocker, J.J., Bartol, F.F., Bazer, F.W., Roberts, R.M., Drost, M.** Maternal recognition of pregnancy in the relation to the survival of transferred embryos: endocrine aspects. *Theriogenology*, 1985., 23: 1, 129-143.

**Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers G., Oldick, B., Schmidt, E.P.** Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.*, 1994, 72 Suppl. 3, 16-30.

**Thatcher, W.W., Wolfenson, D., Curl, J.S., Rico, L.E., Knickerbocker, J.J., Bazer, F.W., Drost, M.** Prostaglandin dynamics associated with development of the bovine conceptus. *Anim. Reprod. Sci.*, 1984, 7, 149-176.

**Thibault, C., Levasseur, M.C.** –La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipses, Paris. 1991.

**Thibodeaux, J.K., Broussard, J.R., Godke, R.A., Hansel, W.** Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst stage embryos or trophoblastic vesicles. *Journal Reprod. Fertil.*, 1994, 101: 3, 657-662.

**Uehara, T. and Yanagimachi, R.** (1976) Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod*, 15, 467-470.

**Ullmann, M.B., Reimers, T.J.** (1989) Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, suppl. 37, 173-179.

**Vajta, G.** (2000) Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 357-364.

**Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H.** (1997a) Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo Letters*, 18, 191-195.

**Vajta, G., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H.** (1997b) Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet Scand*, 38, 349-352.

**Valenzuela, C.Y.** (2005). Ética científica de la clonación humana. *Rev. Med. Chile*, 133, 105-112.

- Visconti, P.E. and Kopf, G.S.** (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59, 1-6.
- Waddington, C.H.**, 1956, Principles of development. Allen and Unwin. London.
- Wall, R.J.** (2002) New gene transfer methods. *Theriogenology*, 57, 189-201.
- Wani, N.A.** (2002) In Vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes: Review. *Small Ruminant Research*, 44, 89-95.
- Watson, E.D., and Zanecovsky, H.G.** Immune function of mononuclear cells isolated from the endometrium of the cow. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International ruminant reproduction symposium. Nice. 1990., Abs 25.
- Weber, J.A., Freeman, D.A., Vanderwall, D.K. and Woods, G.L.** (1991b). prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol. Reprod.* 45: 544-546.
- Wegman, T.G.** Maternal T cells promote placental growth and prevent spontaneous abortion. *Inmunol. Letters*, 1988, 17, 297-302.
- Wilson, J.M., Zalesky, D.D., Looney, C.R., Bondioli, K.R., Magness, R.R.** (1992). Hormone secretion by preimplantation embryos in a dynamic in vitro culture system. *Biology of Reproduction*, 46: 2, 295-300.
- Wiltbank, M.C., Wiepz, G.J., Knickerbocker, J.J., Braden, T.D., Sawyer, H.R., Mayan, M.H., Niswender, G.D.** Cellular regulation of corpus luteum function during maternal recognition of pregnancy. *Reprod. Fertil. and Develop.*, 1992, 4: 3, 341-347.
- Wooding, F.B.P.** Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta.*, 1992, 13, 101-113.
- Yanagimachi, R.** (1994) Mammalian Fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*, (2<sup>nd</sup>ed). Knobil E and Neil JD (eds.). Raven Press, Ltd., New York.
- Yoshioka, K., Takata, M., Taniguchi, T., Yamanaka, H., Sekikaya, K.** Gene expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, 1997, 47, Abstract 221.
- Zavy, M.T., Mayer, R., Vernon, M.W., Bazer, F.W. and Sharp, D.C.** (1979). An investigation of uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J. Reproduc. Fertil.*, 27: 403-411.
- Zoli, A.P., Guilbault, L.A., Delahaut, P., Benitez Ortiz, W., Beckers, J.F.** Radioimmunoassay of a Bovine Pregnancy Associated Glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biology of Reprod.*, 1992, 46, 83-92.
- Zouari, K., Bézard, J., Reinaud, P., Guillomot, M., Palmer, E., and Martal, J.** (1991a) Evidence for the presence of equine trophoblastic interferons during early pregnancy. *Annual. Mtg. Intl. Soc. Interferon Res.*, Nice, France.
- Zouari, K., Reinaud, P., La Bonnardiere, C., and Martal, J.** (1991b). Uterine interferon during early pregnancy and pseudopregnancy in rabbits. *J. IFN Res.*, 11, Suppl. 1 Abstr. S135.



**DISCURSO DE CONTESTACIÓN AL INGRESO EN LA REAL ACADEMIA DE DOCTORES DE ESPAÑA, DEL PROFESOR DR. EMILIO ESPINOSA VELÁZQUEZ POR EL ACADÉMICO NUMERARIO PROFESOR DR. FELIX PÉREZ Y PÉREZ**

Excelentísimo Sr. Presidente,  
Excelentísimos Señoras y Señores Académicos  
Señoras y Señores:

Quiero en primer lugar expresar mi agradecimiento al Excelentísimo Sr. Presidente de la Real Academia de Doctores de España y a su Junta Directiva por haber aceptado en su día la propuesta que formulé a favor del profesor Emilio Espinosa Velázquez para el ingreso en esta Prestigiosa Institución, así como por el resultado positivo en la elección a favor del mismo por los académicos correspondientes. Mi agradecimiento también por haberme concedido el discurso (Laudatio) de presentación en nuestra Academia.

Conocí al profesor Emilio Espinosa en el año 1965, al incorporarme a la Universidad de Zaragoza como Catedrático de Cirugía y Reproducción en la facultad de Veterinaria.

La facultad de Veterinaria pasaba por un momento crítico –a punto de ser trasladada– a la Universidad de Barcelona, a consecuencia del limitadísimo número de alumnos, etc. Esta circunstancia puso a prueba –como me indicaba el señor Rector– mi condición de Catedrático en Zaragoza o en Barcelona. El expediente de traslado se resolvió favorablemente al poco tiempo de mi llegada.

La referida circunstancia resultaba favorable para los alumnos (3-6) por curso, quienes tenían la oportunidad de un contacto más directo con los profesores y obtener en consecuencia el máximo rendimiento académico. Este es el caso de Emilio Espinosa, de quien guardo un excelente recuerdo como alumno ejemplar.

Emilio Espinosa nació en Zaragoza el 21 de julio de 1943, hijo de una familia ejemplar, que tuvo siempre presente los preceptos de Alfonso X “El Sabio”: “Los padres tienen la obligación de facilitar a sus hijos la nutrición material y al mismo tiempo la nutrición espiritual”, es decir: ocuparse de los bienes materiales que aquéllos necesiten y al mismo tiempo proporcionarles la formación educativa para alcanzar un puesto digno y adecuadamente retribuido, al incorporarse a la sociedad. Los padres de Emilio cumplieron a la perfección con estos preceptos y además le educaron en principios: **éticos, morales y confesionales**, la formación ética se refiere a una orientación hacia el bien particular y colectivo, la formación moral se refiere a actuar en la vida siempre dentro del mandamiento legal y la formación confesional es orientar a los jóvenes hacia lo trascendente.

Emilio desde esta formación en principios, desde muy joven se hizo las siguientes preguntas: ¿De dónde vengo?, ¿Dónde estoy?, y ¿Hacia dónde voy?. El hombre como ser inteligente, necesita una formación orientada a lo confesional. Como señala Julián Marías, el ser humano es: **existencia vital**: que nace, crece, se reproduce y muere, y al mismo tiempo es también **esencia trascendente**, de tal manera que la vida material y perecedera ha de terminar en la vida espiritual trascendente y eterna.

Desde estos principios el tránsito de Emilio Espinosa por la Universidad fue un éxito. Cursa los estudios de licenciatura que finaliza en 1966 con Premio Extraordinario, y de Plata de la Cátedra General “Palafox” (1967). Termina el doctorado en 1968, y obtiene, el Premio de Doctorado en 1969, y el Premio Nacional “Coris Gruart” de Investigación en 1975. Ha cursado las especialidades de:

- Inseminación Artificial (1967).
- Zootecnia, por la OCDE, (1968).
- Fisiología de la reproducción por el INRA (Francia, 1969).
- Diplomado en Sanidad, (1973).
- Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial (1974).
- Cirugía animal aplicada y experimental, (1978).

Ha realizado diversos viajes y estancias al extranjero en misión científica y pronunciando más de cincuenta conferencias.

Por lo que se refiere a la actividad docente, el profesor Emilio Espinosa, que hoy presentamos, ha sido profesor en todas las categorías docentes: Ayudante, Adjunto, Agregado y Catedrático. La actividad docente del profesor Espinosa ha sido **ejemplar**: por su dedicación, profundidad cientí-



fica y desarrollo pedagógico que le han llevado a desarrollar diferentes cargos:

- Director del departamento de Patología Animal en la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.
- Vicerrector de Investigación de la referida Universidad (1987-89).
- Vicerrector de Investigación y relaciones internacionales (1989-90).
- Vicerrector en funciones de Reforma y nuevas enseñanzas (1992).

Por lo que respecta a sus publicaciones, merece destacar los 270 trabajos docentes y de investigación publicados entre 1966 y 2010, participación en 54 Congresos, dirigido más de 30 proyectos de investigación en reproducción animal (DGA, EUREKA,...), y proyectos concertados con empresas (CDTI, PROFIT, NEOTEC, CENIT,...).

Tiene publicadas patentes de investigación muy importantes, relacionadas con la biotecnología de la reproducción en acuicultura. Ha obtenido mercedamente los siguientes premios:

- Premio de Licenciatura
- Premio General "Palafox"
- Premio Gobernador Civil de doctorado otorgado por la Universidad de Zaragoza
- Premio Nacional "Enrique Coris Gruart", al trabajo "Control de la reproducción porcina con citrato de clomifeno".

La **labor docente** del profesor Espinosa ha ocupado un espacio importante en el Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), donde ha desarrollado las siguientes actividades:

- Profesor encargado del curso superior en producción y reproducción animal.
- Director de cursos sobre frío y tecnología de productos agrarios.
- Director de Estudios del CIHEAM (Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos)
- Consejero experto en reproducción.
- Consejero Científico del CIHEAM, para la organización de cursos internacionales en reproducción.

El trabajo que acabamos de escuchar: **"El embrión": "Ser vivo, fruto de la reproducción o de la biotecnología en los animales domésticos y en la especie humana"**. Es un ejemplo de la calidad y rigor científico del pro-

fesor Espinosa. En este trabajo se trata, en primer lugar de la evolución del proceso procreativo y de las últimas tecnologías que han enriquecido multitud de cuestiones.

La reproducción es un proceso biotecnológico que arranca nada menos que de la Creación. Dios creó la reproducción “Creced y multiplicaos” mandamiento que hizo a la especie humana y al resto de los seres vivos; a cada uno le dio su pareja, y al hombre poco después, le entregó a la mujer, hecha de su misma carne (soplo divino) que de una costilla del hombre creó y les dijo: “Creced y multiplicaros”, “dominar la tierra y toda la Creación....”

En este magnífico discurso del profesor Emilio Espinosa, define conceptos tan importantes como ¿Qué es el embrión? ¿Dónde empieza la vida?... Temas de total actualidad en nuestros días.

Se detiene en el análisis del proceso gestacional: Reconocimiento maternal de la gestación. ¿Cuándo comienza la gestación?. Así mismo analiza algunos genes implicados en el reconocimiento maternal de la gestación. El W.E.I. del factor SOX9 y en especial el EPF (Early Pregnancy Factor), así como de otros factores de gran interés para explicarnos la fisiología y el comienzo de la gestación. De la calidad de este trabajo científico tenemos noticia a través de su exposición.

En definitiva la personalidad humana, académica, docente y de investigación, quedan bien probadas, por ello no insistiré más, sino en expresar mi satisfacción por la oportunidad que la Real Academia de Doctores de España, me dio en su día y hoy ratificamos para incorporar al profesor Emilio Espinosa a nuestra querida Academia.

Estoy seguro que la aportación de Emilio Espinosa a la Real Academia de Doctores va a ser muy positiva y que de ella me sentiré profundamente orgulloso, señalando que el nuevo académico, mi discípulo destacado, es el mejor exponente a través de sus logros que yo puedo ofrecer para evaluar mi calidad científica y docente.

Deseo reiterar mi felicitación al profesor Emilio Espinosa, a su esposa Julia, a sus hijos y demás familiares y a nuestra querida Real Academia de Doctores de España.

¡Muchas gracias!