

FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

Iván Valencia Llerena., Iván Valencia Madera

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico y tratamiento moderno de los problemas de infertilidad de la pareja se basa en el entendimiento de los eventos fisiológicos que regulan el proceso reproductivo en la especie humana. Estrategias terapéuticas como la inducción de la ovulación y la estimulación ovárica controlada, tienen como base el reclutamiento de varios folículos al inicio de cada ciclo menstrual, por lo que es indispensable conocer las características morfológicas y los eventos endocrinos que regulan la producción de gametos. El presente capítulo tiene por objeto resumir de una manera práctica y aplicable en la clínica diaria los fundamentos de la fisiología de la reproducción⁽¹⁻⁴⁾.

Gametogénesis

El proceso reproductivo de la especie humana se basa en la liberación cíclica de un ovocito maduro a mitad de cada ciclo menstrual, y su unión en la trompa de Falopio con uno de los espermatozoides depositados en la vagina durante el acto copulatorio. La producción, tanto del gameto femenino como del masculino, sigue un curso similar en las primeras semanas de desarrollo embrionario, para posteriormente diferenciarse según la carga cromosómica adquirida durante la fertilización.

Espermatogénesis

Cada testículo está dividido en aproximadamente 250 lóbulos, cada uno conteniendo 1 a 4 altamente enrollados túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos contienen las células de Sertoli que envuelven, mantienen y nutren a las células germinales. Los túbulos seminíferos están cubiertos por el epitelio germinal que produce los espermatozoides. Las células de Leydig están localizadas en los espacios entre los túbulos seminíferos (células intersticiales) y producen y secretan testosterona. Es importante estar familiarizado con el proceso de la espermatogénesis, para poder entender ciertos valores y hallazgos morfológicos en el análisis del semen. Por ejemplo, cuando se realiza un análisis de semen se pueden observar células redondas que pueden representar precursores espermáticos. También se puede notar la presencia de gotas citoplásmicas. Estas gotas citoplásmicas son citoplasma residual de cuando la espermátide se desarrolló en espermatozoide durante la espermiogénesis (proceso de maduración final por el cual una espermátide pasa a espermatozoide).

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las células espermátogénicas sufren transformaciones y una serie de divisiones celulares para producir espermatozoides haploides. Este proceso dura aproximadamente 10 semanas. La espermatogénesis ocurre en

el epitelio germinal de los testículos. La secuencia celular es: espermatogonia, espermatocito primario, espermatocito secundario, espermatide y finalmente espermatozoide. La espermatogénesis empieza durante la pubertad y continúa ininterrumpidamente a lo largo de la vida del hombre. Durante la pubertad se necesita tanto de hormona folículo estimulante (FSH) como de hormona luteinizante (LH) para el inicio de la producción de espermatozoides. En los adultos no se requieren niveles normales ni de FSH ni de LH para mantener la espermatogénesis. El inicio de la espermatogénesis en hombres con hipogonadismo hipogonadotrópico, adquirido post-puberalmente, se puede lograr con el reemplazo de LSH solamente. Para mantener una producción normal de espermatozoides se requiere el reemplazo de ambas gonadotropinas en estos pacientes.

Existen básicamente 2 tipos diferentes de espermatogonias (tipo A y tipo B). Estas células sufren mitosis para mantener la población con las células tipo B encargadas de la espermatogénesis.

La espermatogénesis se puede dividir en un fase mitótica y una fase meiótica. Durante la fase mitótica una proporción de las células germinales, espermatogonias tipo A, entran en una serie de divisiones mitóticas y tras la quinta división mitótica se diferencian en espermatogonias tipo B. Las espermatogonias tipo B se dividen mediante mitosis en espermatocitos primarios.

Los espermatocitos primarios entran en la fase meiótica de la espermatogénesis. La primera división meiótica produce espermatocitos secundarios que, a diferencia de la ovogénesis la cual produce una célula grande como el ovocito y una pequeña como el cuerpo polar, las divisiones meióticas de los espermatocitos producen dos células de tamaño igual. La segunda división meiótica da lugar a la formación de espermatides redondas con contenido cromosómico haploide. En la Figura 1 se muestran los estadios de la espermatogénesis.

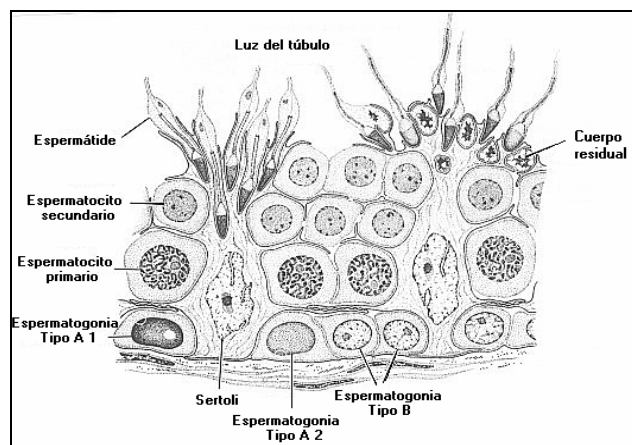


FIGURA 1. Espematogénesis

Espermiogénesis

La espermiogénesis es el proceso mediante el cual las espermatides redondas se transforman en elongadas para posteriormente transformarse en espermatozoides. Durante

la espermiogénesis, el ADN espermático se asocia con proteínas básicas llamadas protaminas y se vuelve extremadamente condensado. Es durante este proceso que se forman el acrosoma, cola y pieza intermedia y la mayoría del citoplasma se elimina. Una vez formado el espermatozoide maduro es liberado en la luz del túbulo seminífero en un proceso llamado espermiación y transportado dentro de la rete testis, ductos eferentes y caput epididimario.

Ovogénesis

Las células germinales u ovogonias se originan en el endodermo primitivo del saco vitelino y hacia la quinta y sexta semana de gestación se puede identificar células germinales en el saco vitelino y cerca de la alantoides⁽⁵⁾. Las células germinales migran a través del mesenterio hacia las crestas gonadales. Durante esta migración el número de ovogonias aumenta por mitosis. En la semana 5 se observan en el embrión entre 700 y 1300 de ovogonias y para la semana 8 se pueden identificar aproximadamente 600.000 ovogonias en el ovario en desarrollo.

Después de que las células germinales alcanzan las crestas gonadales continúa su proliferación mediante divisiones mitóticas sucesivas y alcanzan un total máximo de 6 a 7 millones de ovocitos en la semana 20 de gestación, en ambos ovarios. Mediante mecanismos de apoptosis y de atresia a lo largo del proceso de desarrollo y diferenciación de las células germinales, su número disminuye y al nacimiento se encuentran solamente 1'000.000 a 2'000,000 de ovocitos, 400.000 al momento de la menarca y muy pocos al momento de la menopausia. Figura 2.

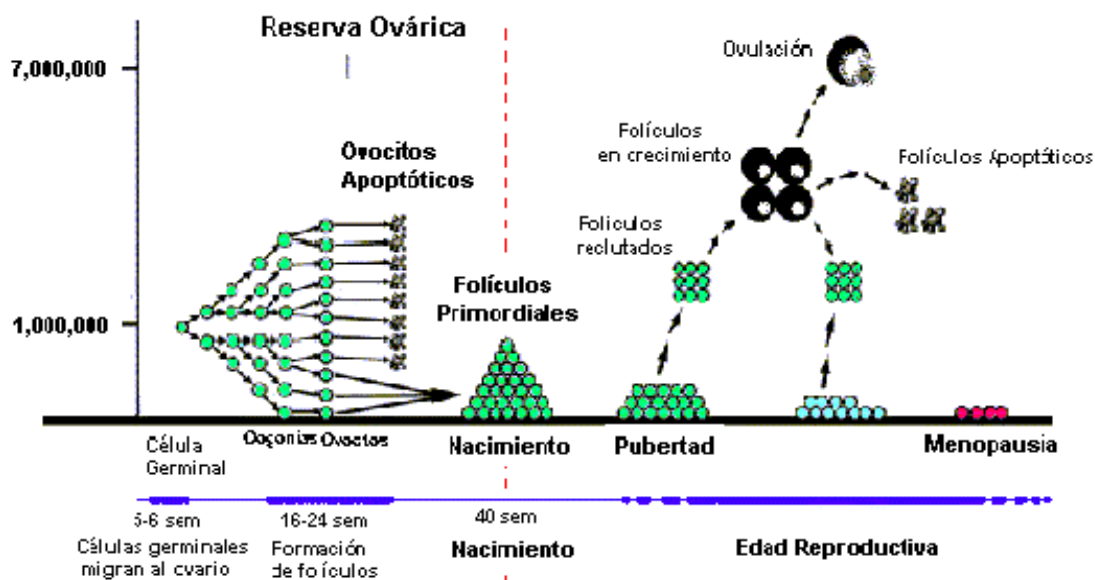


FIGURA 2. Dotación de células germinales y atresia folicular. Las células germinales migran al ovario durante el desarrollo embrionario temprano y aumentan su número a través de divisiones mitóticas sucesivas, pero la mayoría de los ovocitos formados durante

el desarrollo no sobreviven al momento del nacimiento. Modificado de Kaipia & Hsueh 1997.

El proceso de diferenciación del ovario requiere de la presencia de dos cromosomas X y en mujeres con carga cromosómica XO el desarrollo folicular es incompleto y la tasa de atresia es acelerada, por lo que al nacimiento se observan estrías gonadales en lugar de ovarios normales.

Las células germinales ocupan la periferia o corteza del ovario. Las ovogonias continúan dividiéndose por mitosis hasta que se convierten en ovocitos primarios a partir de la semana 8 a 12 post-fertilización. Los ovocitos primarios entran en meiosis pero detienen su división en estadio de diploteno donde permanecerán quiescentes, para hasta reactivarse después de la pubertad en un ciclo menstrual. La segunda división meiótica ocurre después de la ovulación y se completa con la fertilización. Figura 3. La meiosis parece estar controlada por factores autócrinos producidos localmente por el ovario, probablemente originados en la rete testis. Las células de la granulosa secretan el factor inhibidor de la meiosis, el cual detiene a los ovocitos en diploteno. Posteriormente, una sustancia iniciadora de la meiosis la reactivará al momento de la ovulación.

Después de que el ovocito primario entra en estadio de diploteno es envuelto por una capa de células de granulosa, constituyéndose el folículo primordial. Estas células de la granulosa están separadas del estroma adyacente mediante una membrana basal. Este proceso de incorporación de los ovocitos primarios en folículos primordiales continúa a lo largo del embarazo y termina aproximadamente a los 6 meses de vida extrauterina. Los ovocitos no incorporados en folículos sufren degeneración y son la mayoría de las células germinales desaparecidas al momento del nacimiento. Los primeros folículos primordiales están localizados en la parte interna de la corteza, cerca de la médula. Aproximadamente alrededor de las 20 semanas de vida fetal los folículos empiezan a crecer bajo la influencia de las gonadotropinas circulantes, y para el séptimo mes de gestación la maduración folicular alcanza el estado antral.

Después del nacimiento el peso del ovario aumenta de 250 gramos hasta alcanzar los 400 mg. al momento de la menarca. Durante la infancia y la niñez continúa el crecimiento y la atresia folicular activamente. La maduración final de los folículos en la pubertad ocurre en respuesta a los niveles crecientes de FSH y LH.

Durante la edad madura los ovarios humanos pesan entre 10 y 20 gramos en promedio. Los folículos se encuentran envueltos en tejido conectivo de la corteza ovárica y pueden dividirse en dos tipos funcionales: folículos primordiales en reposo y folículos en crecimiento. La mayoría de los folículos (90 a 95%) están en fase de reposo durante la vida reproductiva. El reclutamiento de un folículo primordial inicia un dramático cambio en el crecimiento, estructura y función del folículo. Los folículos en crecimiento se dividen en 5 categorías básicamente: primarios, secundarios, terciarios, preovulatorios y atrésicos. Los primeros tres estadios ocurren sin la influencia de las gonadotropinas y están controlados por mecanismos intraováricos.

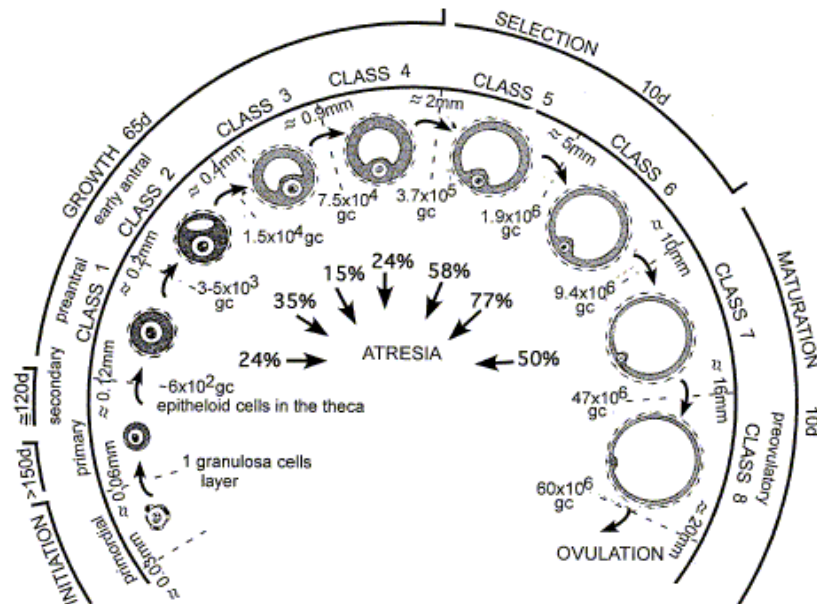


FIGURA 3. Estructura y clasificación de los folículos ováricos durante el crecimiento y desarrollo. Adaptado de Erickson.

Folículo primordial

Los folículos primordiales se componen de una sola capa de células fusiformes de la granulosa y un ovocito maduro detenido en estadio de diploteno. El ovocito mide aproximadamente 30 μ m. Las células de la granulosa proyectan procesos protoplásmicos que alcanzan la lamina basal aportando así una ruta de transporte de nutrientes. El folículo no tiene un contacto directo con la circulación sanguínea y se encuentra aislado en un microambiente aislado de otras células por la lámina basal. Figura 4.

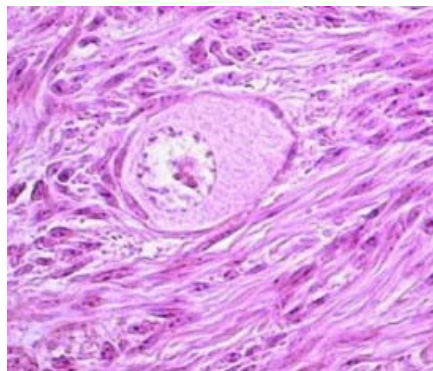


FIGURA 4. Folículo primordial

Folículo primario

El primer signo del crecimiento folicular es la diferenciación de las células de la granulosa que adoptan una configuración cuboidal dentro de la lámina basal, para luego sufrir divisiones mitóticas y formar un estrato multicapa de células de la granulosa. Las células de la granulosa en estrecha proximidad con el ovocito se denominan corona radiata. El ovocito crece y produce una sustancia mucoide llamada zona pelúcida que lo rodea y lo separa de las células de la granulosa. Figura 5. La zona pelúcida contiene receptores de espermatozoides especie específicos, previene la polispermia y promueve el movimiento del ovocito fertilizado dentro de la trompa uterina hacia la cavidad uterina.

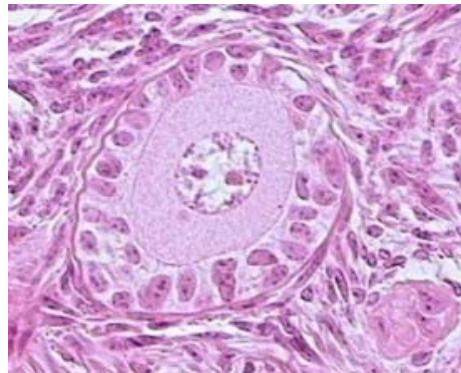


FIGURA 5. Folículo primario. Una vez iniciado el crecimiento las células de la granulosa se vuelve cuboideas. El ovocito secreta la zona pelúcida.

Folículo secundario

El folículo secundario se forma por la proliferación de las células de la granulosa y por la fase de crecimiento final del ovocito que alcanza las 120 μm de diámetro. El diámetro del folículo aumenta progresivamente hasta los 180 μm y contiene aproximadamente 5.000 células de la granulosa. Las células estromales por fuera de la lámina basal se diferencian y se disponen concéntricamente alrededor del folículo para formar la teca interna y externa. Es en este estadio que el folículo adquiere un aporte sanguíneo independiente conformado por una arteria que termina en un plexo capilar en la lámina basal. Figura 6. Los capilares no penetran la membrana basal, de tal manera que la granulosa y el ovocito permanecen avasculares. En este momento aparecen los cuerpos de Call-Exner.

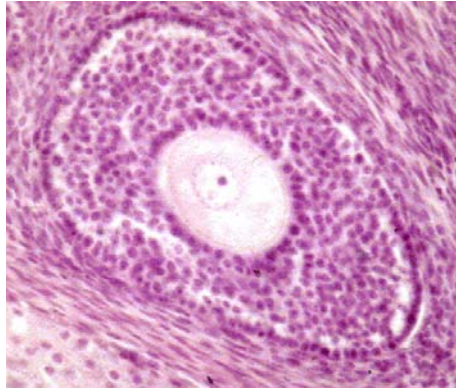


FIGURA 6. Folículo secundario. El folículo secundario posee varias capas de células de la granulosa y se forma la teca interna y externa.

Folículo terciario

El folículo terciario se caracteriza por la hipertrofia de la teca y la aparición de un espacio líquido entre las células de la granulosa llamado antro. El antro contiene un trasudado plasmático y productos de secreción de la granulosa. Las células granulosa y teca desarrollan uniones especializadas llamadas uniones estrechas o “gap junctions”. Estas uniones estrechas permiten la comunicación entre las células y la sincronización de la función folicular. Figura 7.

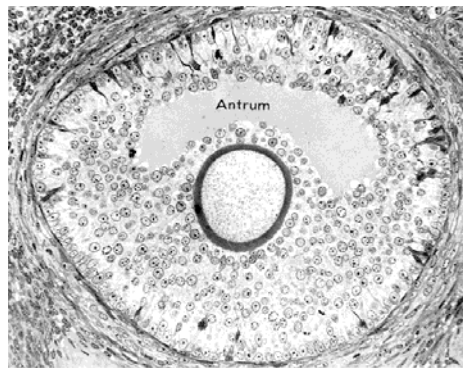


FIGURA 7. Folículo antral

Folículo preovulatorio o de de Graff

El folículo terciario aumenta rápidamente de tamaño bajo la influencia de las gonadotropinas para formar el folículo preovulatorio. Durante este estadio las células de la granulosa y el ovocito permanecen encapsulados por la lámina basal y no tienen una vascularización directa. El líquido del antro aumenta de volumen y el ovocito, rodeado por una acumulación de las células de la granulosa (el cúmulus oophorus) ocupa un posición excéntrica dentro del folículo. La diferenciación y actividad de las células de la granulosa

varía según se encuentre mayor cantidad de receptores de LH en las células cercanas a la membrana basal y menor cantidad en las adyacentes al ovocito. Figura 8. El folículo preovulatorio madura libera el ovocito al momento de la ovulación. La progresión de la meiosis en el ovocito maduro se asocia con la pérdida de la membrana nuclear con desintegración de la vesícula germinal, condensación de la cromatina en cromosomas bivalentes, separación de los cromosomas homólogos y detención en metafase II. La meiosis se completa con la liberación del segundo cuerpo polar al momento de la fertilización.

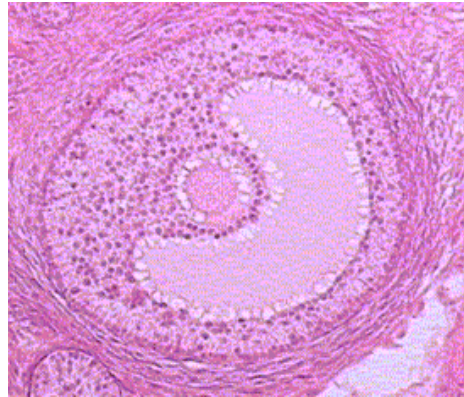


FIGURA 8. Folículo preovulatorio. La secreción activa de las células de la granulosa expande el antro. Se distingue el cumulus oophorus. El ovocito está en metafase II.

Estroma ovárico

El estroma ovárico consiste de tres tipos principales de células: células de tejido conectivo similar a la de otras localizaciones, células contráctiles y varios tipos de células intersticiales. Las células intersticiales secretan andrógenos y sufren modificaciones morfológicas bajo la influencia de la LH y la hormona gonadotropina coriónica (hCG). Se originan del mesénquima embrionario. El ovario contiene 4 categorías de células intersticiales: primarias, secundarias, tecales e hiliares.

Las células intersticiales primarias son las primeras en aparecer y se semejan a las células de Leydig del testículo fetal, siendo capaces de secretar esteroides. Las células secundarias se derivan de la teca de los folículos atrésicos. Estas células se hipertrofian y mantienen su capacidad de secreción de esteroides, ya que permanecen sensibles a la acción de la LH y adquieren innervación catecolaminérgica. Las células intersticiales tecales en los folículos terciarios son el sitio de secreción activa de andrógenos. Se desarrollan del mesénquima que se diferenció cuando se formaron los folículos secundarios. Contienen receptores de LH y las enzimas 3-B hidroxisteroide deshidrogenasa y Delta^{4,5}-isomerasa. Al degenerar el folículo estas células dan origen a las células intersticiales secundarias. El hilio ovárico contiene las células hiliares. Estas células contienen cristales de Reinke y son indistinguibles de las células de Leydig testiculares y secretan testosterona en respuesta al estímulo de la LH.

Dinámica del crecimiento folicular

En el humano la cantidad de folículos primordiales disponibles, o reserva ovárica, disminuye conforme avanza la vida de la mujer. Como ya se mencionó, la mayoría de los folículos sufrirán el fenómeno de atresia pero a estadios variables de desarrollo. El crecimiento y atresia de los folículos es un fenómeno continuo que no se detiene ni siquiera en momento de anovulación fisiológica como el embarazo y la lactancia, ni en estados de anovulación crónica como el ocasionado por el uso de anticonceptivos. Sin embargo, el crecimiento folicular en estas condiciones es limitado y no avanza más allá del estadio de folículo preantral o antral temprano. La interregulación de estos dos fenómenos fisiológicos –crecimiento y atresia- está gobernado por mecanismos complejos que fueron estudiados inicialmente por Gougeon⁽⁴⁾.

El reclutamiento de varios cientos o miles de folículos primordiales para salir del estado en reposo en que se encuentra, se denomina reclutamiento inicial⁽⁸⁾. Los folículos primordiales en reposo son reclutados de manera constante para entrar en el pool de folículos en crecimiento. Una vez iniciado el crecimiento y llegar al estadio de folículo antral sólo les queda el camino de la atresia, a menos que sean rescatados por el aumento intercíclico de FSH. Durante el reclutamiento inicial, factores intraováricos y otros desconocidos estimulan a los folículos primordiales para que entren en actividad después de haber estado quiescentes por meses e incluso por décadas. Alternativamente, el reclutamiento inicial puede deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que mantienen a los folículos en estado de reposo. El fenómeno de apoptosis elimina continuamente folículos a lo largo del desarrollo a la vez que se van agregando nuevos folículos al pool de folículos en desarrollo.

Por el contrario, el reclutamiento cíclico se refiere al rescate de un grupo de folículos antrales de entre 2 a 5 mm de diámetro y ocurre debido al aumento de la concentración de FSH durante cada ciclo reproductivo después de la pubertad. Los ovocitos de estos folículos han completado su crecimiento, poseen zona pelúcida y son competentes para resumir la meiosis.

No se conoce cuando ni cuáles factores son los responsables del inicio de la diferenciación de los folículos primordiales. En los humanos el crecimiento folicular activo empieza cuando el núcleo del ovocito alcanza un tamaño crítico de 19 μm y cuando aproximadamente posee 15 células de la granulosa en un corte transversal mayor. Una vez que ha iniciado el crecimiento del folículo primordial, probablemente se requieren aproximadamente 300 días para que complete su desarrollo a folículo primario⁽⁴⁾.

Se ha implicado a las gonadotropinas, especialmente a la FSH, como el factor que inicia el crecimiento de los folículos primordiales ya que se ha visto que tanto en la infancia como en la edad avanzada es mayor la proporción del reclutamiento inicial; sin embargo, los datos son contradictorios ya que en mujeres hipogonadotrópicas, fetos anencefálicos y en ratas mutantes deficientes de FSH continua el crecimiento inicial, aunque en menor proporción.

Recientemente se ha implicado al ovocito en el inicio del crecimiento folicular debido a la identificación en ovocitos humanos del factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9). Sin embargo, sólo ha podido identificarse en folículos primarios en adelante por lo que su papel en el reclutamiento inicial está aún por determinarse⁽⁹⁾.

El folículo primario tarda aproximadamente 120 días en completar su desarrollo y convertirse en folículo secundario. Factores de crecimiento como el GDF-9 o el kit de unión están implicados en el crecimiento del ovocito.

El folículo secundario (estadio I) necesita aproximadamente entre 65 y 75 días para pasar por los estadios antral temprano y antral tardío para alcanzar el estadio 5, cuando con un diámetro de 2 a 5 mm entra en el pool de folículos antrales reclutables. Folículos sanos de diámetro entre 2 a 5 mm (clase 5) se observan todo momento durante el ciclo menstrual. Aquellos que están presentes durante la fase lútea tardía constituyen la población a partir de la cual emergerá el folículo destinado a ovular en el siguiente ciclo menstrual. El número de folículos clase 5 durante la fase lútea tardía es aproximadamente de 3 a 11 por ovario en mujeres menores de 33 años y disminuye marcadamente con la edad. El reclutamiento cíclico y la selección son un proceso continuo mediante el cual, a través de selección negativa, el folículo más sensible al efecto de la FSH bloquea el crecimiento del resto de la cohorte y ocurre durante la fase intercíclica mediante la elevación de FSH que termina con la dominancia de un folículo.

El crecimiento folicular posterior requiere de la estimulación de las gonadotropinas, especialmente de la FSH. Figura 9. Se distinguen 3 pasos sucesivos:

1. Reclutamiento cíclico, que corresponde a la entrada del crecimiento terminal de un grupo de folículos (estadios 5 a 8).
2. Selección folicular, que resulta en la emergencia del futuro folículo ovulatorio.
3. Dominancia folicular, ejercida por el folículo seleccionado y que conducirá a la atresia a los otros folículos.

La selección folicular involucra al folículo con mayor índice mitótico de las células de la granulosa y, generalmente, al de mayor diámetro. El folículo continúa su crecimiento mientras que la FSH disminuye y aparecen signos de atresia en los otros folículos. En caso de administración exógena de FSH estos folículos destinados a la atresia pueden ser recuperados.

La dominancia del folículo seleccionado es claramente evidente en la fase folicular tardía. El crecimiento continúa hacia los estadios 7 y 8, mientras que los niveles de FSH continúan disminuyendo. Este crecimiento preferencial se debe al mayor aporte vascular del folículo dominante así como al aumento de la respuesta a la FSH, producida por mecanismos autócrinos basados en la producción de factores de crecimiento como el IGF-1 por parte de las células de la granulosa. La evolución de estos estadios de desarrollo folicular hacia la ovulación o la atresia está dirigida por la capacidad de aromatización de las células de la granulosa. El folículo dominante posee una alta actividad de aromatización de andrógenos.

El folículo dominante madura y secreta cantidades crecientes de estrógenos. Los niveles de estrógenos alcanzan un pico hacia el final de la fase folicular y si este pico es de amplitud y duración adecuada, desencadena la liberación de LH mediante un sistema de retroalimentación positiva.

En resumen, el desarrollo folicular temprano tiene lugar a lo largo de varios ciclos menstruales y se requieren aproximadamente 85 días para que un folículo preantral alcance el estadio preovulatorio. La entrada de los folículos en la cohorte de folículos en crecimiento tiene lugar de manera continua y se produce por oleadas, lo que significa que en todo momento de la vida de la mujer, independientemente de si esté embarazada o no, use o no anticonceptivos⁽¹⁰⁻¹²⁾, hay folículos preantrales listos para responder a la señal endócrina correcta y continuar su desarrollo final.

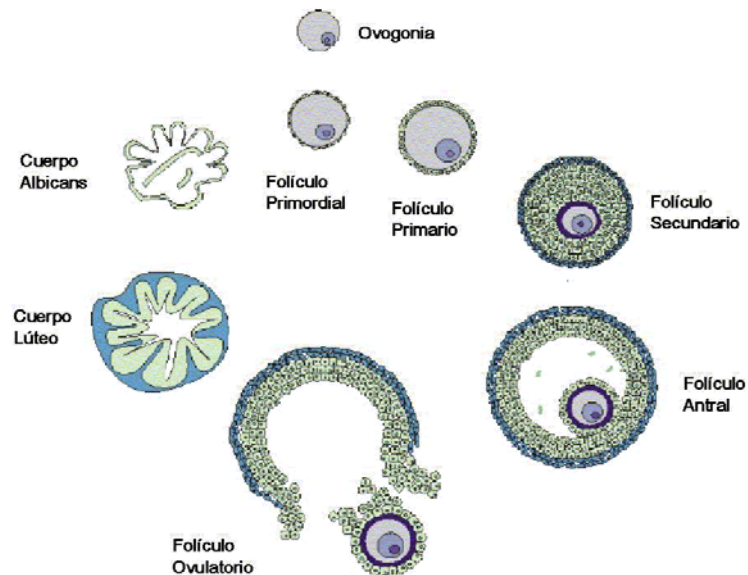


FIGURA 9. Etapas del crecimiento folicular

Período preovulatorio y ovulación

Al final de la fase de crecimiento el folículo maduro reacciona a la liberación de gonadotropinas para completar la maduración citoplásmica y nuclear del ovocito. Las células del cúmulus secretan una gran cantidad de ácido hialurónico que se acumula en los espacios intercelulares y provoca la disociación de las células del cúmulus seguido de su ruptura y así el ovocito, rodeado de una porción de las células de la granulosa y de la corona radiata, es liberado con el líquido folicular. La formación del estigma preovulatorio en el ápice del folículo sufre un proceso de isquemia y de proteólisis enzimática que debilita la pared del folículo y permite la expulsión suave del contenido folicular. La producción de activador del plasminógeno activa la producción de colagenasa que disocia las fibras de la teca, al mismo tiempo que la producción de prostaglandinas induce una serie de contracciones rítmicas de los mioblastos de las paredes foliculares y del estroma cortical que produce, en último término, la expulsión del contenido folicular.

El ovocito completa su maduración citoplásmica y nuclear bajo el influjo de la LH. Los gránulos corticales del ovocito migran hacia la periferia y se adhieren hacia la membrana plasmática. La meiosis se reactiva, se expulsa el primer cuerpo polar y los cromosomas se alinean en metafase II en espera del complemento cromosómico espermático, en caso de fertilización futura.

El cuerpo lúteo

Después de la expulsión del ovocito el folículo se transforma en cuerpo lúteo, que es el responsable de la producción hormonal que transformará el endometrio, previamente proliferado por los estrógenos, para hacerlo receptivo del embrión. La lámina basal desaparece completamente y la angiogénesis invade toda la pared del cuerpo lúteo. Los vasos sanguíneos invaden completamente las células de la granulosa y se abren en la cavidad folicular llenándola rápidamente con un coágulo central que modificará su aspecto durante la fase lútea. Las células de la granulosa adquieren inclusiones lipídicas citoplásmicas necesarias para la producción de esteroides sexuales y se transforman en células luteales grandes responsables de la producción de esteroides, especialmente de progesterona. Las células de la teca interna constituyen las células luteínicas pequeñas que se sitúan en la periferia del cuerpo lúteo y que se entrelazan desde esta posición con las células luteínicas grandes.

CICLO ENDOMETRIAL

Cambios morfológicos cíclicos en el endometrio, gobernados por el ambiente hormonal predominante en cada fase del ciclo menstrual, lo preparan para el proceso de implantación embrionaria en caso de producirse la fertilización o lo preparan para la menstruación, en caso de que no se produzca la fertilización del ovocito durante ese ciclo ovárico. La capa funcional del endometrio sufre cambios a lo largo del ciclo menstrual y se elimina durante la menstruación conservándose la capa basal, a partir de la cual se regenerará una nueva capa funcional cada mes. El ciclo uterino endometrial puede dividirse en tres fases: fase proliferativa, fase secretora y fase menstrual.

La fase proliferativa empieza con el final de la menstruación. Para el día 5 a 6 del ciclo la cavidad uterina está completamente reepitelizada y empieza el crecimiento del estroma endometrial. Tan pronto queda expuesta la capa basal por el desprendimiento de las capas suprayacentes empieza la proliferación epitelial, sustentado por la proliferación de fibroblastos que le ofrecen una superficie en la cual las células epiteliales pueden deslizarse para cubrir toda la superficie. Esta reparación endometrial se produce a pesar del nivel estrogénico bajo propio de los primeros días del ciclo ovárico, y se produce en respuesta al daño tisular más que a la estimulación estrogénica. A pesar de esto, la capa basal es rica en receptores de estrógenos. Los cambios más pronunciados ocurren a nivel de las glándulas endometriales cuyo epitelio responde a los niveles estrogénicos en aumento producidos por el folículo en crecimiento. Al comienzo las glándulas son estrechas, tubulares y tapizadas por una capa de células columnares. Las glándulas endometriales presentan mitosis activas y al final de la fase proliferativa se observa pseudoestratificación de los núcleos de las

células glandulares. El estroma endometrial denso y compacto al inicio de la fase proliferativa, empieza a sufrir edematización para convertirse en un sincicio al final de esta fase. Las arterias espirales son rectas y sin ramificaciones al comienzo de la fase proliferativa y avanzan progresivamente hasta alcanzar la membrana basal del epitelio de superficie, donde forman una red capilar. Figura 10. El endometrio crece de 0.5 mm, al final de la menstruación, hasta alcanzar 3.5 a 5 mm de altura gracias a que el estroma endometrial se ha vuelto a edematizar.

La ovulación marca el fin de la fase proliferativa y da inicio a la fase lútea. Los cambios que ocurren después de la menstruación siguen un curso predeterminado, lo que permite el fechado endometrial con bastante precisión cuyos pioneros fueron Noyes, Hertig y Rock⁽¹³⁾. El crecimiento endometrial se detiene en una altura fija (5 mm aproximadamente) a pesar de los niveles constantes de estrógenos. Esta inhibición del crecimiento es debido a la acción de la progesterona sobre la acción estrogénica. La progesterona induce la producción de 17- B hidroxisteroide deshidrogenasa y sulfotransferasas que transforman el estradiol en el estrógeno menos activo, estrona, el cual es eliminado de la célula.

El primer signo de la ovulación es la aparición de vacuolas de glicógeno subnuclear en el epitelio glandular alrededor del día 17 ó 18. Progresivamente las vacuolas migran hacia la membrana apical para verter su contenido en la luz de la glándula. Las arterias espirales continúan su crecimiento y al estar la altura del endometrio fija sufren enrollamiento. Así mismo, las glándulas endometriales se vuelven tortuosas.

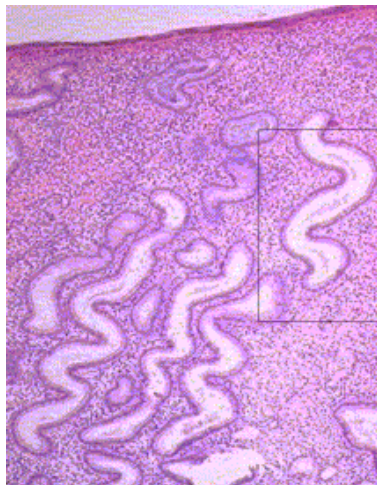


FIGURA 10. Endometrio de fase secretora

Para el día 13 postovulatorio, la capa funcional del endometrio se ha diferenciado en el estrato esponjoso compuesto por estroma edematoso con arterias espirales enrolladas y glándulas endometriales exhaustas, y sobre éste el estrato compacto, donde las células estromales se han convertido en grandes y poliédricas. Los cuellos glandulares atraviesan este segmento, son comprimidos y menos prominentes. Los capilares subepiteliales se encuentran congestionados.

Al momento de la implantación, alrededor del día 21 a 22 del ciclo, los cambios más importantes son a nivel del estroma endometrial mediado por la producción de prostaglandinas inducida por estrógenos y progesterona. El aumento de prostaglandinas aumenta la permeabilidad vascular. No se observan mitosis después del día 22. Las células estromales una vez transformadas en células deciduales debido al rescate del cuerpo lúteo por la gonadotropina coriónica embrionaria, producen factores de crecimiento como IGF-1, proteínas fijadoras de IGF, renina y relaxina, entre otras. La predecidualización empieza alrededor de los vasos sanguíneos a partir de células estromales originadas del mesénquima uterino primitivo. Las células deciduales controlan la invasión del trofoblasto y sus productos intervienen en los eventos autocrinos y paracinos del embarazo.

En ausencia de fertilización, para el día 23 del ciclo menstrual el cuerpo lúteo empieza a degenerar y los niveles hormonales a disminuir. La caída de estrógenos y progesterona inicia los eventos que conducen a la menstruación: reacción vasomotora, apoptosis, pérdida de tejido y menstruación. El fenómeno más importante es la disminución de la altura del estroma y la marcada respuesta vasomotora de las arterias espirales. Con la disminución del diámetro endometrial se detiene el flujo sanguíneo dentro de las arteriolas. Para el día 25 a 26 del ciclo la endotelina y la tromboxina producen la vasoconstricción de las arterias espirales. El flujo venoso se detiene y se produce vasodilatación. Cada ciclo de vasoconstricción y espasmos se vuelven cada vez más profundos y prolongados hasta producir isquemia endometrial. El endometrio es invadido por leucocitos y se produce diapédesis hacia el espacio intersticial. La progesterona inhibe la lisis de las membranas celulares de los lisosomas, los cuales ahora liberan lisosimas que digieren los componentes celulares produciendo mayor liberación de prostaglandinas, extravasación de glóbulos rojos, necrosis y trombosis vascular. Las metaloproteínas de la matriz extracelular degradan a los componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal. Existe un plano de separación natural entre la capa basal y el estrato esponjoso y cuando la desorganización tisular alcanza este nivel, el estroma edematoso del estrato esponjoso se descama, colapsa y aparece la menstruación. Figura 11.

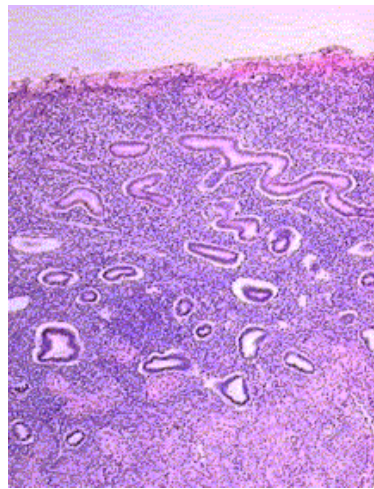


FIGURA 11. Endometrio de fase menstrual

TRANSPORTE DE GAMETOS

Transporte del gameto femenino y del pre-embrión

El ovocito maduro, junto con sus células del cúmulus oophorus, liberado durante la ovulación está embebido en una sustancia gelatinosa que lo adhiere a la superficie del ovario, sobre el estigma folicular, a la espera de ser captado por la trompa de Falopio. Las lengüetas fimbriales de la trompa de Falopio, con movimientos de vaivén, se aproximan sobre la superficie ovárica para capturar al óvulo. Dos a tres minutos después de la ovulación el complejo ovocito-cúmulus entra en la trompa, sin embargo, hay evidencia de que puede ser un poco mas lenta (15 minutos)⁽¹⁴⁾. Ciertamente existen variaciones en este proceso ya que mujeres con una sola trompa y un solo ovario contralateral consiguen embarazo, lo mismo que cuando se depositan espermatozoides y óvulos en el peritoneo mediante punción transvaginal⁽¹⁵⁾. Mientras la fimbria barre la superficie ovárica, las células granulosas del complejo cúmulus ooforus se exponen a la corriente líquida creada por el latido rápido de los cilios de la superficie de la fimbria. Esta corriente lleva a las células de la granulosa hacia el ostium abdominal y se quedan en la región ampular de la trompa mientras que el óvulo, dentro del cúmulus oophorus, es llevado hacia el infundíbulo tubárico. Este proceso puede tomar minutos a horas. Una vez en la ampolla se produce la fertilización. Las corrientes de líquido inducidas por los cilios son el principal medio de transporte para conducir al cúmulus hacia la unión ampuloistmica. El tiempo es de minutos desde la fimbria, y horas desde la ovulación. El cúmulus se detiene en la unión ampuloistmica debido a la masa de células granulosas, al diámetro disminuido de la luz del istmo (1 mm) y al reducido número de cilios dentro del mismo. Se considera que la fertilización ocurre mas frecuentemente en la ampolla y particularmente en la unión ampuloistmica. El rápido transporte ciliar desde la fimbria conduce al cúmulus oophorus al medio ambiente nutritivo de la región proximal de la ampolla.

Una vez eyaculados los espermatozoides en la vagina y pasado a través del moco cervical, se movilizan a través de la cavidad uterina, trompa intramural e istmo, mediante una combinación de movimientos de propulsión propia, contracciones miométriales y miosalpingueales retrógradas y por la corriente de líquido tubario. Después de la capacitación los espermatozoides se hiperactivan y penetran la zona pelúcida, se produce la reacción acrosomal y posteriormente la fertilización. Después de 24 horas en la ampolla proximal el cúmulus ooforus se disipa para facilitar la entrada del cigoto dentro del istmo. El embrión permanece en el istmo por dos días. Mediante movimientos de vaivén, gradualmente la mórula desciende a la cavidad uterina donde eclosiona el blastocitos 4 días después de la ovulación. Pasan 3 días hasta que finalmente se implanta. La fertilidad en la mujer se afecta poco cuando hay pérdida sustancial de la longitud ístmica (comparado con el ámpula), lo que sugiere que el miosalpinx ístmico poco papel tiene en la entrada del embrión a la cavidad uterina, ya que sólo se necesita una pequeña porción de istmo para realizar esta función en la especie humana.

Transporte de los gametos masculinos

La vagina generalmente se considera un medio hostil del cual los espermatozoides deben migrar rápidamente para poder sobrevivir. El pH vaginal normal es de 3.5 a 4.0, en contraste del pH óptimo para la supervivencia espermática que es de 7.0 a 8.5 y se conoce que la motilidad se afecta marcadamente en un pH menor a 6.0. Varios factores entran en juego durante la inseminación para neutralizar la acidez vaginal que incluyen los fluidos lubricantes de la vagina producidos durante la estimulación sexual que elevan el pH a 4.2-4.5; además, el líquido seminal es por sí mismo alcalino, pH 7.5. Se ha reportado un incremento del pH vaginal a 7.0 dentro de los primeros 8 segundos de la eyaculación, confirmando estudios de Master y Johnson que midieron seriadamente el pH vaginal después del coito y demostraron que el pH vaginal permanece por arriba de 6.0 hasta por 2 horas⁽¹⁶⁾. En consecuencia de estas observaciones los espermatozoides rápidamente pierden su motilidad en la vagina.

En los seres humanos se puede encontrar espermatozoides dentro del moco cervical dentro de 1.5 a 3 minutos después de la eyaculación. A diferencia vaginal, el pH del moco cervical normal permanece alcalino a lo largo del ciclo menstrual, con un pico de 8.4 en el día del pico de LH, coincidiendo con el pico de la penetrabilidad espermática.

El endocérnix está cubierto por un epitelio columnar alto compuesto por dos tipos celulares primarios: células secretoras no ciliadas y células ciliadas. Las células secretoras contienen glicoproteínas y están cubiertas por microvilli. Las células ciliadas tienen cinocilios que muestran *in vitro* un latido hacia la vagina. Se ha propuesto que la corriente del latido ciliar provaginal sirve para orientar el moco cervical dentro de canales de baja viscosidad o cuerdas que lo guían desde una unidad secretora de moco hacia el canal cervical y el orificio cervical externo, asegurando la depuración y reabastecimiento del moco y probablemente proveen una vía de baja resistencia que facilita la migración y almacenaje espermáticos.

El moco cervical es producido por las células no ciliares por un mecanismo de secreción merocrina en el cual la célula permanece intacta. No está bien definido si el moco cervical se secreta con sus fases gel e hídrica completamente desarrolladas e hidratadas, o primariamente como molécula de mucina que forma una malla que adquiere su fase acuosa como un transudado sérico. La producción del moco cervical está bajo control hormonal. El moco estrogénico es abundante, acuoso, delgado en consistencia, claro, acelular y apoya la penetración y sobrevivencia espermáticas. El moco cervical progestagénico es escaso, grueso, opaco, celular e inhibe la penetración espermática. El pico en la cantidad y “spinnbarkeit” del moco cervical ocurre 1 día antes del pico de LH y el nadir de la viscosidad, celularidad y formación de helechos del moco cervical y la penetración espermática ocurre en el día del pico de LH. Se producen cerca de 60 mg/día de moco cervical en la fase folicular temprana y casi 700 mg/día a medio ciclo.

El moco cervical es un hidrogel, o sea un fluido heterogéneo de dos fases con componentes de alta y baja viscosidad. La fase gel de alta viscosidad, insoluble, está compuesta por una malla de mucina. Las macromoléculas filamentosas de mucina forman una malla de micelas interconectadas, ya sea unidas por puentes disulfuro o enrollada al azar, formando

una malla tridimensional cuyas espacios intermicelares contienen la fase acuosa. El tamaño de la fase acuosa depende del grado de hidratación o puentes, o ambos, entre las micelas que, en cambio, están influenciadas hormonalmente. En la fase periovulatoria, cuando el moco es delgado y acuoso, los espacios intermicelares son amplios como para permitir la penetración espermática. Bajo influencia progestacional disminuye la hidratación y los espacios intermicelares disminuyen de tamaño, restringiendo de este modo la penetración espermática.

El contenido acuoso varía entre 85 y 92% en la fase lútea y 95 a 98% a la mitad del ciclo. La fase acuosa consiste de electrolitos disueltos (cloruro de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, cobre y hierro). Permanece isotónico a lo largo del ciclo menstrual. También contiene elementos de bajo peso molecular como glucosa, maltosa, manosa, lípidos (fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y ácidos grasos libres), AMP cíclico, glicógeno y aminoácidos libres. También contiene proteínas séricas y no séricas así como enzimas e inhibidores de enzimas. Muchas de las proteínas solubles, incluyendo inmunoglobulinas, muestra un nadir en la porción periovulatoria del ciclo.

El contenido total y la proporción de ácido siálico en el moco cervical es de una gran importancia durante el período periovulatorio y se puede aumentar con el uso de estrógenos.

Transporte espermático rápido

Considerando el pH óptimo para la sobrevivencia espermática, la diferencia de pH entre la vagina (3.5 a 4.0) y el moco cervical a la mitad del ciclo (8.0) así como el efecto evanescente del efecto buffer del fluido seminal, no es sorprendente que poco espermatozoides sobrevivan en la vagina más de 30 minutos.

La rápida entrada de los espermatozoides en el moco cervical es necesaria para asegurar la sobrevivencia de una subpoblación mótil. Mas inesperado es la rapidez con que los espermatozoides habitan el tracto reproductor superior. El mecanismo y la posible explicación biológica del transporte rápido de espermatozoides tiene implicaciones en la evaluación clínica de la infertilidad cervical y la interacción moco-semen. Se ha reportado espermatozoides en la trompa de Falopio 5 minutos después de la inseminación; así mismo, el número total de espermatozoides en la trompa es directamente proporcional al número inseminado y la población de espermatozoides tubarios se estabiliza en 15 minutos. En estado estable, 1 de cada 2000 espermatozoides inseminados permanece en el moco cervical y 1 de cada 14 millones se encuentra en el oviducto.

El mecanismo del transporte rápido de espermatozoides probablemente sea un fenómeno pasivo. La teoría que mejor explica el transporte pasivo piensa que son responsables las contracciones coordinadas de la vagina, útero y trompas de Falopio, especialmente durante el orgasmo. Las prostaglandinas seminales y la endotelina-1 también tienen un papel importante. Sin embargo, el significado de este transporte rápido no está muy claro. Hay evidencia de que los primeros espermatozoides en entrar en el tracto reproductor superior no son funcionales; además, se requiere de su capacitación para modificar la membrana

cefálica del espermatozoide para que sea capaz de sufrir la reacción acrosomal. El proceso de capacitación requiere tiempo.

Transporte retardado y reservorio espermático

El moco cervical a la mitad de ciclo es alcalino y los espermatozoides que tienen acceso al canal endocervical permanecen viables por muchas horas, y probablemente hasta por 7 días. El espermatozoide fertilizante alcanza la trompa más tarde, generalmente después de que se ha realizado la capacitación. Dado que los espermatozoides vaginales son rápidamente no viables, los espermatozoides móviles tienen que originarse de otro lugar. En la coneja, los mecanismos de retención y liberación espermática incluyen adhesión espermática a la superficie epitelial y supresión reversible de la motilidad.

En el humano, probablemente el cérvix con sus glándulas endocervicales sea el reservorio espermático. En los rumiantes, los espermatozoides están distribuidos disparejamente concentrándose cerca de la mucosa y también hay evidencia de motilidad espermática disminuida en estos sitios y de adherencia a las superficies mucosas. No se ha establecido el hecho de que los espermatozoides en las criptas o adheridos a la mucosa cervical, sean capaces de alejarse y migrar a la trompas de Falopio. Puede ser que los espermatozoides en el moco cervical permanezcan ahí y representen una población excluida, atrapada en el tracto genital inferior.

Está claro que los espermatozoides humanos en el moco cervical retienen su capacidad funcional por lo menos por varios días. Clínicamente hay una correlación entre fertilidad y número de espermatozoides en el moco cervical 48 horas después de una inseminación intrauterina con semen donado. Espermatozoides recuperados del moco cervical 80 horas después de inseminación artificial son capaces de penetrar la zona pelúcida humana y espermatozoides recuperados 120 horas después son móviles y tienen velocidades de traslación comparables con esperma fresco capacitado. Casi el 100% de los espermatozoides viables recuperados del moco cervical, 3 días después de la inseminación intrauterina, tienen acrosoma intacto y estos espermatozoides son capaces de sufrir la reacción acrosomal en respuesta a un estímulo biológico.

Capacitación

Para poder penetrar las varias capas del ovocito el espermatozoide contiene varias enzimas, entre las cuales están la hialurodinasa, la enzima penetradora de la corona y la acrosina, dentro del acrosoma. La reacción acrosomal es un proceso que involucra la fusión localizada de secciones de la membrana de doble capa del acrosoma, lisis de estas secciones fusionadas, vesiculación, dispersión y liberación del contenido acrosomal. El requisito para la reacción acrosomal es la capacitación. La capacitación comprende modificaciones de la membrana de la cabeza espermática para volverla capaz de sufrir la reacción acrosomal. Es importante que esta reacción ocurra en la inmediata vecindad del oocito y para este fin se ha demostrado que el líquido seminal contiene un factor de descapacitación de alto peso molecular, que altera la membrana cefálica para prevenir que

ocurra la reacción acrosomal prematuramente. La capacitación se puede completar in vitro en 5 a 7 horas.

En vivo la capacitación del espermatozoide ocurre durante su permanencia en el tracto reproductor femenino y el moco cervical parece estar involucrado. El proceso de capacitación se puede mantener por largo tiempo. Sin embargo, el mecanismo de la capacitación es poco conocido. El proceso de capacitación es reversible mientras que la reacción acrosomal es irreversible. Figura 12. No se producen cambios morfológicos durante la capacitación. Cambios fisiológicos están claramente asociados con el estado de capacitación como se refleja por la motilidad hiperactiva. Enzimas del líquido seminal y moco cervical pueden estar involucradas. Se piensa que la enzima penetradora de la corona es una proteasa y en el plasma seminal hay actividad inhibidora de proteasas. La remoción o modificación de estos inhibidores por enzimas contrarreguladoras en el moco cervical, o por tracción biomecánica mientras los espermatozoides son empujados a través de la malla de filamentos de mucina, puede intervenir en la capacitación. La capacitación no es indispensable para lograr embarazos in vitro, ya que mediante la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) se logran embarazos utilizando espermatozoides recuperados de testículo e inyectados directamente al óvulo, sin el paso previo de la capacitación en el tracto reproductivo. La capacitación se acompaña de hiperactivación de la motilidad espermática, ya que varía el patrón de latido flagelar de baja amplitud que favorece la motilidad progresiva, a uno de alta amplitud con poca progresión. Incluye además una disminución de la relación colesterol/fosfolípidos de la membrana espermática, pérdida de componentes que recubren la superficie espermática (factor inhibitorio del plasma seminal) y adquisición de la actividad de unión a la zona pelúcida.

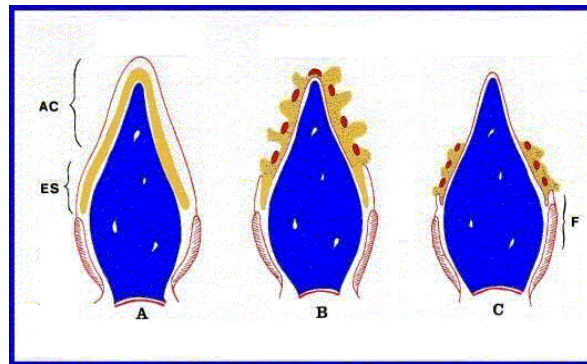


FIGURA 12. Reacción acrosómica. A) Acrosoma intacto, B) Reacción acrosómica en curso, C) Reacción acrosómica completa. Ac acrosoma, ES segmento ecuatorial, F sitio de fusión con la membrana ovocitaria.

Selección espermática

El moco cervical periovulatorio restringe selectivamente la migración de espermatozoides morfológicamente anormales, encontrándose mayor proporción de formas normales en el cuello uterino y en el líquido uterino que en el semen. El mecanismo de la selección

espermática no está del todo claro, pero probablemente resulta tanto de propiedades intrínsecas del esperma como de la interacción moco-esperma. Los espermatozoides morfológicamente anormales son menos móviles y se desplazan con menor velocidad que los normales. La migración espermática a través de un medio de cultivo también selecciona una población morfológicamente enriquecida, efecto explicado por las diferencias intrínsecas en la motilidad espermática, pero la proporción de formas normales es mayor después de que el mismo eyaculado migra a través de una columna de moco. Los espermatozoides morfológicamente normales nadan más rápido, pero la frecuencia y amplitud del latido flagelar son diferentes entre espermatozoides normales y anormales. Lo anterior sugiere que los espermatozoides morfológicamente anormales encuentran una mayor resistencia en el moco cervical y que esta diferencia, en vez de un vigor espermático disminuido, es responsable de la exclusión de estas células anormales.

FERTILIZACIÓN

Sólo muy pocos espermatozoides alcanzan el ámpula tubárica y entran en contacto con el ovocito. La unión del espermatozoide con el óvulo se basa en la organización molecular de la superficie celular de cada gameto, sobre las cuales existen moléculas de reconocimiento y adhesión. La interacción del espermatozoide con el ovocito durante la fertilización ocurre en tres niveles: i) el cúmulus oophorus, ii) la zona pelúcida, que induce la exocitosis del contenido del acrosoma y, iii) la membrana plasmática del ovocito que concluye fusionándose con la membrana del espermatozoide. El contacto inicial ocurre cuando los espermatozoides se adhieren a la zona pelúcida una vez atravesados las células del cúmulus oophorus. Los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto son capaces de unirse a la zona pelúcida a través de la membrana de la cabeza del espermatozoide. Figura 13. Esta unión es prerequisite importante para la penetración de la zona pelúcida para iniciar los eventos que culminan en la inducción de la reacción acrosómica.

La zona pelúcida está compuesta por 3 glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3. La membrana del espermatozoide se une a la ZP3, evento que induce la reacción acrosómica. La reacción acrosómica expone y modifica regiones de la superficie del espermatozoide que lo hacen capaz de interactuar con la membrana del ovocito. La reacción acrosómica permite que el espermatozoide se adhiera fuertemente a la ZP2 a través de la cual alcanza la superficie del ovocito ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Después del ingreso del espermatozoide al espacio perivitelino se produce la unión y fusión de las membranas de los gametos, el paso del espermatozoide al interior del óvulo. La unión del espermatozoide a la superficie ovocitaria ocurre en la superficie lateral de la cabeza, siendo el punto de unión más firme en el segmento ecuatorial. Este paso requiere movilidad espermática pero tan pronto se produce la fusión de las membranas, el espermatozoide se detiene y posteriormente la cola es incorporada al ovocito. En la fusión de las membranas participan varias moléculas de adhesión. La cabeza del espermatozoide contiene una molécula denominada fertilina, la cual es considerada como la responsable de la fusión de las membranas de los gametos. La fertilina beta es miembro de la familia ADAM (A Disintegrin and A Metalloprotease domain) y participa en la fusión de las

membranas a través de la interacción de sus dominios de desintegrina con la integrina en la superficie del ovocito⁽²⁰⁾.

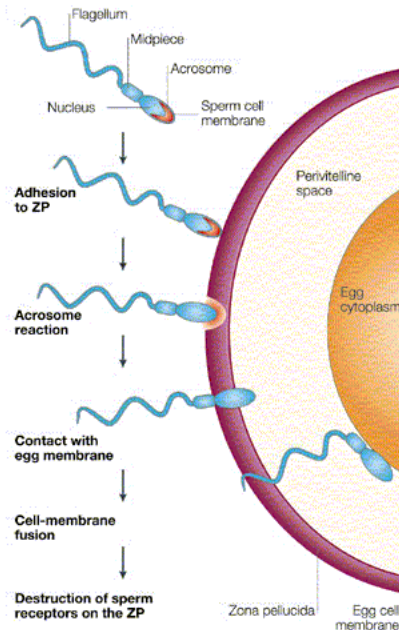


FIGURA 13. Fertilización. Adaptado de Nature

La fusión del espermatozoide desencadena una serie de reacciones en el ovocito para impedir la entrada adicional de espermatozoides y evitar la poliespermia. Inmediatamente después de la fusión de los gametos se produce la reacción cortical, ocasionando un endurecimiento de la zona pelúcida que la torna refractaria a la unión y penetración de espermatozoides supernumerarios. Se previene la unión de otros espermatozoides mediante la inactivación del receptor primario de espermatozoides, proteína ZP3, y la penetración en la zona pelúcida se detiene mediante modificaciones en el receptor secundario de espermatozoides, la proteína ZP2. La reacción cortical incluye la exocitosis de los gránulos corticales y la liberación de su contenido en el espacio perivitelino compuesto por enzimas proteolíticas que digieren los receptores de superficie. Estas reacciones se producen por un aumento oscilatorio de los niveles de calcio intracelulares y se cree que los espermatozoides contienen una proteína, oscilina, que desencadena la activación del ovocito.

La fusión de los gametos induce reacciones en el ovocito que culminarán con la activación del programa de desarrollo embrionario. La activación del ovocito requiere la participación obligada del calcio intracelular, y puede inducirse in vitro partenogénicamente a través de varios estímulos que aumentan el calcio intracelular. La unión con el espermatozoide causa una producción persistente de inositol trifosfato y un aumento en la permeabilidad del calcio de la membrana plasmática responsable de mantener las oscilaciones internas de calcio. La oscilina, además, se correlaciona con la habilidad del espermatozoide de disparar las oscilación de calcio⁽²²⁾.

La activación conduce a la reanudación del ciclo celular y culminación de la segunda división meiótica con expulsión del segundo cuerpo polar y la entrada del ovocito en interfase, con formación del pronúcleo femenino. La formación del pronúcleo femenino se produce unas pocas horas después de la fertilización.

La fertilización es un proceso orquestado que desencadena una serie de eventos que resultan en la unión de los genomas paternos y maternos, y el establecimiento del potencial mitótico del cigoto. Para iniciar el desarrollo embrionario las estructuras del espermatozoide fertilizante se deben desamblar y transformar en componentes del cigoto por interacción con el citoplasma del ovocito. Estas interacciones incluyen: descondensación del núcleo del espermatozoide con formación del pronúcleo masculino, ensamblaje del centrosoma cigótico, reunión de proteínas centrosómicas y presencia de los microtúbulos del aster espermático alrededor del centriolo espermático. Tanto la formación del pronúcleo masculino como el ensamblaje del centrosoma cigótico son pasos cruciales requeridos para la aposición de los pronúcleos y la unión del genoma.

El núcleo del espermatozoide se descondensa y transforma en pronúcleo masculino. El desarrollo de la cromatina materna y del pronúcleo masculino está regulado por factores citoplásmicos ovocitarios comunes que regulan el ciclo celular y dependen de la madurez del ovocito. Figura 14.

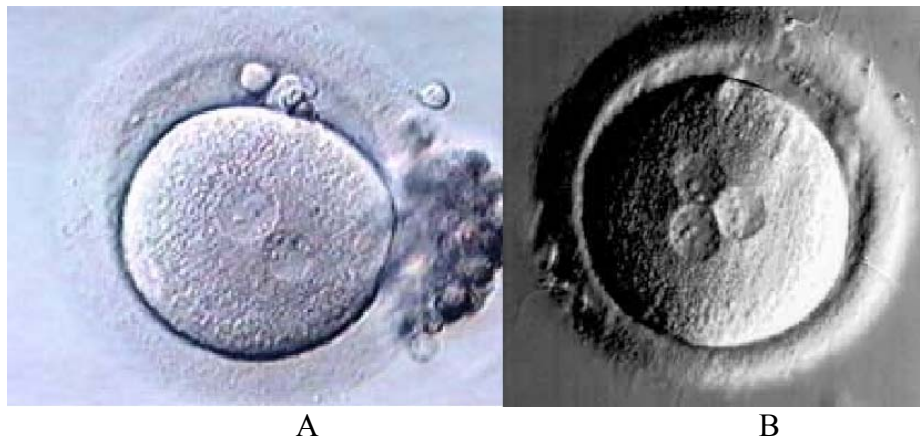


FIGURA 14. Ovocito fertilizado en estadio de pronúcleos. A) Fertilización normal. B) Fertilización triploide.

La fertilización en los humanos requiere de una estructura única, el aster espermático. Esta estructura se forma dentro del ovocito y comprende microtúbulos dispuestos radialmente y está organizada por la incorporación del centrosoma espermático. El centrosoma espermático se replica durante la primera división celular para formar los dos polos del huso mitótico requerido durante el clivaje. Ovocitos con falla de fertilización durante tecnologías in vitro muestran configuraciones microtubulares aberrantes. La función del centrosoma espermático refleja su potencial de fertilización ⁽²³⁾.

Los pronúcleos entran en contacto en el centro del ovocito y el aster espermático crece durante esta migración. La envoltura nuclear se desintegra posteriormente y los cromosomas entran en contacto. La organización espacial del conjunto de microtúbulos en la célula depende de los centros de organización, los centrosomas (24). Los centriolos en el humano se derivan del padre y los de la madre permanecen inactivos. Eventualmente se produce la mezcla de los cromosomas y se establece el genoma del embrión. Este proceso se denomina singamia.

CLIVAJE

Las consecuencias del estadio de clivaje son la producción de un organismo multicelular a partir de una célula, el cigoto, y la adquisición de grupos celulares totipotenciales diferentes, que darán lugar a los diversos órganos del ser humano. El incremento en el número de células ocurre sin producirse un aumento del tamaño de las mismas, ahora denominadas blastómeras, que con las divisiones sucesivas se vuelvan cada vez más pequeñas. Figura 15.

El ciclo celular durante el clivaje se diferencia del ciclo celular de las células somáticas en que no posee fase G1 ni G2 y posee una fase G0 muy corta. El acortamiento de la fase S se realiza por la activación simultánea de varias unidades de replicación de ADN, ya que con cada división de las blastómeras hay más ADN disponible.

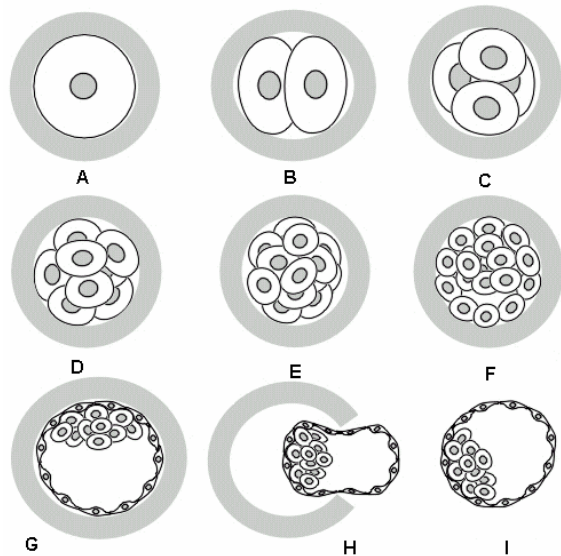


FIGURA 15. Clivaje embrionario. A: Cigoto; B: estadio 2 células; C: estadio 4 células, D: estadio 8 células, E: estadio Mórula, F: estadio blastocisto temprano; G: estadio blastocito expandido, H: estadio blastocisto en eclosión, I: estadio blastocito exclosionado.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) nos permiten un mayor acercamiento a los eventos de división embrionaria hasta hace apenas 2 décadas completamente hipotéticos en la especie humana. Ahora podemos estudiar la división embrionaria en el laboratorio, lo que nos ha permitido comprender tanto el desarrollo temprano del ser humano así como los fenómenos que impiden que se lleve adelante correctamente. El crecimiento del embrión in vitro es ligeramente más lento que en condiciones in vivo, pero se pueden hacer algunas consideraciones pertinentes que nos permitirán comprender mejor los criterios de selección embrionaria que se aplican durante la fertilización in vitro y transferencia de embriones.

La variación en el tiempo en que los pre-embryones entran en división y se observan los varios estadios de clivaje es grande. En términos generales, los óvulos maduros cumplen la fertilización 5 horas después de la inseminación, comienzan la síntesis de ADN entre 9-10 horas y la fase S del ciclo celular dura 3 a 5 horas. La fase G2 dura aproximadamente 4 a 6 horas, mientras que la mitosis dura 3 a 3.5 horas. La fase G1 dura aproximadamente 6 horas⁽²⁵⁾.

El tiempo medio entre la inseminación y el estadio de 2 células es aproximadamente 35 horas (Día 1). El tiempo medio para la segunda división (4 células) es 45 horas (Día 2). En este día las blastómeras son claramente visibles y no deben presentarse fragmentos citoplásmicos. La síntesis de proteínas hasta este momento utiliza las reservas de ARNm del ovocito. El tiempo medio para la tercera división (8 células) es aproximadamente 54 horas (Día 3). Empieza a producirse la activación del genoma embrionario al utilizarse ARNm derivado de la transcripción de su ADN. El desarrollo embrionario es más rápido cuando se utiliza la ICSI para la inseminación^(26,27).

El número de células presentes el ritmo de división de los embriones cultivados in vitro y es un indicador importante de la capacidad de desarrollo e implantación. En días 2 y 3 de desarrollo, los embriones con un ritmo de división normal deben haber alcanzado el estadio de 2-4 células y 7-8 células, respectivamente.

El embrión de 8 células sufre un proceso de compactación mediante el cual uniones estrechas aparecen entre las blastómeras, que permiten el flujo de iones e información entre las mismas. La compactación es el primer evento de diferenciación morfogénica y celular. Durante este fenómeno aparecen dos líneas celulares; las blastómeras que permanecen en contacto con el exterior del embrión producirán el trofoectodermo, mientras que las células del interior del embrión formarán la masa celular interna.

Para el final del día 4 de desarrollo se acumula líquido entre las blastómeras de la mórula y se forma la cavidad del blastocisto o blastocele. Posteriormente, el blastocele se expande hasta cubrir casi completamente el volumen del embrión y en este momento se denomina blastocisto expandido. El proceso de eclosión puede apreciarse el día 5 por la tarde o durante el día 6. En la Tabla I se puede observar un resumen del tiempo medio necesario para el clivaje de embriones in vitro.

TABLA I: Tiempo de clivaje embrionario registrado post inseminación después de fertilización in vitro

No. células	Tiempo en horas (embriones con clivaje normal y anormal)		Tiempo promedio para clivaje (error estándar)	Estadio de clivaje medio de 42 embriones (error estándar)
	Trounson, 1982.	Edwards, 1981		
			Trounson, 1982	Edwards, 1981
2	27-43	21-57	35.6 (± 4.4)	33.2 (± 1.3)
4	36-65	40-79	45.7 (± 8.3)	49 (± 1.3)
8	45-73	44	54.3 (± 12.6)	64.8 (± 1.8)
16	68-85			80.7 (± 2.4)

IMPLANTACIÓN

La implantación embrionaria es un proceso dinámico que requiere una serie de interacciones celulares específicas y cambios endometriales⁽³⁰⁾. Las fases de la implantación incluyen: 1) Aposición, 2) Adhesión y 3) Invasión.

Aproximadamente 4 días después de la ovulación (día 18 del ciclo), el embrión entra en la cavidad uterina en estadio de mórula compacta o blastocisto temprano y permanece en las secreciones uterinas aproximadamente 48 a 72 horas mientras finaliza su proceso de desarrollo hasta blastocisto expandido y logra salir de la zona pelúcida. Entre los días 4 a 5 postovulatorios (días 18-19 del ciclo) el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida y entre los días 5 y 7 postovulatorios empieza a interactuar con la superficie uterina.

El endometrio debe estar sincronizado con el blastocisto de modo que cuando entra en contacto con la superficie del endometrio ésta debe estar receptiva al contacto. El período durante el cual el blastocisto está receptivo se denomina ventana de implantación⁽³¹⁾.

Los embriones genéticamente anormales se dividen más lentamente que los normales y, por tanto, no estarán listos para implantarse cuando esté abierta la ventana de implantación. Por otro lado, si el embrión normal entra a la cavidad uterina y el endometrio no está preparado para interactuar con el embrión, éste permanece suspendido en la cavidad uterina y eventualmente degenera.

Pueden ocurrir dos tipos de defectos endometriales que alteran el momento en que el endometrio es receptivo. En el primer tipo de defecto, la ventana de implantación está atrasada y, por tanto, desplazada hacia un tiempo posterior en el ciclo menstrual. En el segundo tipo, el endometrio nunca es receptivo por lo que no existe ventana de implantación. El endometrio puede ser no receptivo debido a una exposición inadecuada de hormonas, pobre perfusión endometrial, condiciones inflamatorias concomitantes (endometriosis, hidrosalpinx, endometritis) y a un deficiente estado nutricional de la mujer.

Se ha demostrado que el proceso de implantación es similar al proceso por el cual los leucocitos se adhieren y penetran a las células endoteliales de las vénulas. Figura 16.

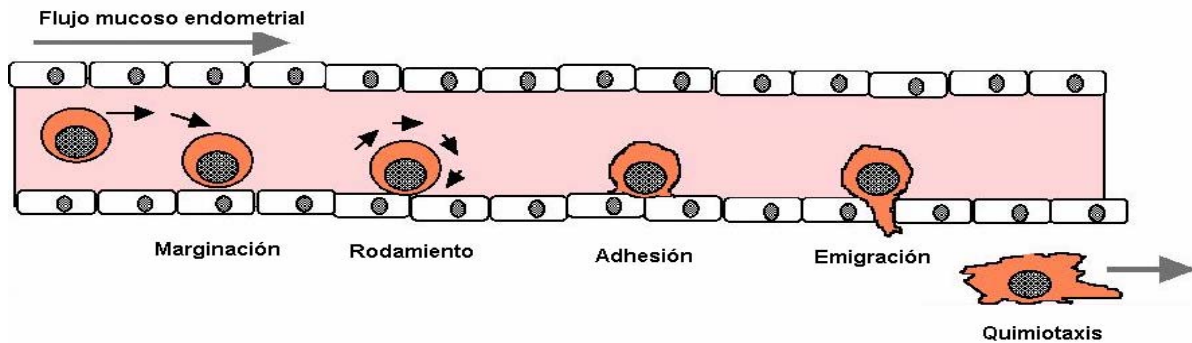


FIGURA 16. Mecanismo de implantación embrionaria. Los eventos que ocurren durante la implantación son semejantes a los que sufre el leucocito durante su movilización hacia el espacio extracelular.

El primer contacto entre el blastocisto y la superficie endometrial ocurre aproximadamente en el día 19 del ciclo. Las fases de la implantación están mediadas por largas moléculas de mucina que se extienden desde las membranas de las células endometriales dentro de la cavidad uterina. Estas moléculas de mucina promueven la marginación y rodamiento del blastocisto sobre la superficie endometrial. Durante el día siguiente (día 20 del ciclo), una fibronectina especializada del trofoblasto llamada trofouteronectina o fibronectina fetal, empieza a interactuar con la mucina endometrial. Esto induce una estrecha aposición entre el blastocisto y el endometrio. El siguiente paso es la adhesión que está mediada por las integrinas endometriales. Aproximadamente en el día 21 del ciclo la trofouteronectina se une con las integrinas endometriales como la integrina $\alpha_3\beta_3$. Esta unión induce la reacción de invasión del blastocisto completando el proceso de implantación embrionaria. Figura 17. La adhesión mediada por integrinas es mucho más firme. La unión de las integrinas provoca la internalización o emigración del blastocisto a través de las células endometriales (32,33)

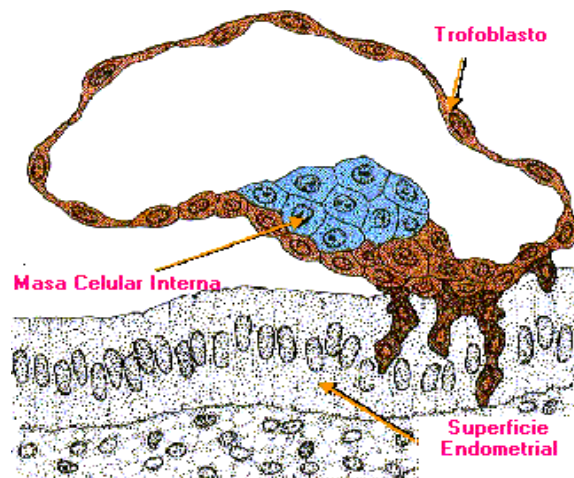


FIGURA 17. Blastocisto implantándose

Durante la invasión, delgados pliegues de trofoectodermo invaden los espacios entre las células endometriales. En la punta de estos pliegues las integrinas anclan el trofoblasto a la membrana basal. Esta unión desencadena la secreción de proteasas (metaloproteinasas de matriz) que digieren la membrana basal. Algunas células del trofoectodermo se fusionan para formar un sincicio. Este sincicio prolifera e invade la matriz extracelular endometrial. Las células trofoectodérmicas se transforman en citotrofoblasto, migran entre el sincicio y son seguidas por el estroma embrionario, lo cual dará lugar a la formación de la placenta.

Endometrio durante la ventana de implantación

La receptividad endometrial es un estado de diferenciación endometrial caracterizado por un cambio en la morfología del epitelio de superficie^(34,35). Figura 18. Las células endometriales muestran en su superficie microvellosidades que durante la ventana de implantación se fusionan para formar una estructura única llamada pinópodo⁽³⁶⁾. Los estudios secuenciales con microscopía de barrido de muestras de endometrio han demostrado que los pinópodos se forman durante un período de uno a dos días únicamente y se relacionan con la implantación. Para el día 22 del ciclo los pinópodos prácticamente han desaparecido y las microvellosidades son más prominentes. Para el día 23 las microvellosidades siguen proliferando y cubren casi toda la superficie endometrial y para el día 24 la superficie endometrial aparece con forma de domo y cubierta por microvellosidades pequeñas y gruesas⁽³⁷⁾.

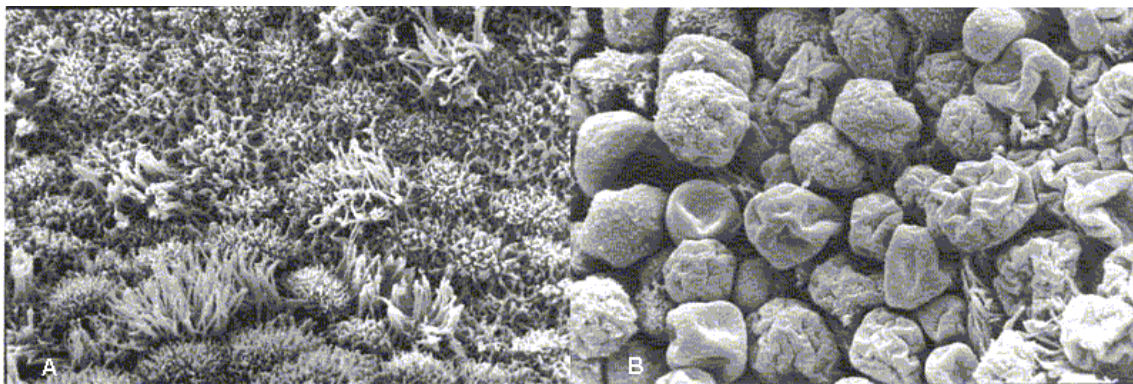


FIGURA 18. Formación de pinópodos durante la fase de receptividad endometrial. A) Día LH + 4, B) Día LH + 7. Adaptado de Nikas 2002⁽³⁴⁾

En promedio, la formación de pinópodos es más temprana en ciclos estimulados (días 19-20) y más tardía en ciclos sustituidos (días 21-22) comparado con ciclos naturales (días 20-21). Sin embargo, hay una gran variación en el momento que aparecen durante el ciclo menstrual. Los pinópodos son progesterona-dependientes y se detectan sólo al momento de la adherencia del blastocisto⁽³⁸⁾.

El papel que juegan los pinópodos en el proceso de implantación se ha cuestionado en los últimos años^(39,40). Estudios de microscopía electrónica han demostrado que el blastocisto

no se adhiere a la superficie de los pinópodos. Se ha sugerido que los pinópodos absorben secreciones de la superficie endometrial y favorecen la aposición del blastocisto sin representar un punto de anclaje para la implantación; sin embargo, no se ha podido comprobar la naturaleza picnótica de los pinópodos humanos, a diferencia de los de otras especies, por lo que la función de estas estructuras es desconocida y sólo sirven como un marcador de la receptividad endometrial⁽⁴¹⁾.

El inicio de la receptividad endometrial es dependiente de la regulación a la baja de los recetores epiteliales de progesterona y estradiol, inducida por la progesterona. Cuando el embrión entra en la cavidad uterina se produce una secuencia de eventos preprogramados que incluyen la producción y secreción por parte del endometrio y del embrión de una multitud de factores bioquímicos como citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión que vuelven al endometrio receptivo al blastocisto.

Estos factores incluyen glicodelina, citocinas como el factor inhibidor de leucemia, la interleucina 1, el factor estimulante de colonias, integrinas como la $\alpha v \gamma 3$, prostaglandinas y la MUC1, y proveen la base para la comunicación entre el endometrio y el embrión bajo la influencia de los esteroides sexuales. La expresión y/o secreción de estas sustancias dentro de la cavidad uterina se pueden utilizar como marcadores de receptividad endometrial^(42,43).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adashi E, Rock J, Rosenwaks Z. Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technolog. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1996.
2. Speroff L, Glass R, Kase N. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 6th edition, 1999.
3. Fawcett D, Jensch R. Bloom and Fawcett: Concise Histology. Oxford University Press, 2nd edition, 2002.
4. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996, 17:121-55.
5. Buehr M. The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Exp Cell Res* 1997, 232:194-207.
6. Kaipia A, Hsueh A. regulation of follicle atresia. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:349-63.
7. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relations. *Endocr Rev* 1985; 6:371-379.
8. Mcgee E, Hsueh A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000, 21:200-14.
9. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 2001, 76:943-9.
10. van Heusden AM, Coelingh Bennink HJ, Fauser BC. FSH and ovarian response: spontaneous recovery of pituitary-ovarian activity during the pill-free period vs. exogenous recombinant FSH during high-dose combined oral contraceptives. *Clin Endocrinol* 2002, 56:509-17.
11. Macklon NS, Fauser BC. Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm Res* 1999, 52:161-70.
12. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 1997,18:71-106.
13. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975, 122:262-3.
14. Croxatto H, Ortiz M. Egg transport in the fallopian tube. *Gynecol Invest* 1975, 6:215-25.
15. Sharma V, Pampiglione JS, Mason BA, Campbell S, Riddle A. Experience with peritoneal oocyte and sperm transfer as an outpatient-based treatment for infertility. *Fertil Steril* 1991, 55:579-82.
16. Masters WH, Johnson VE, Kolodny RC, Tullman GD. In vivo evaluation of an effervescent intravaginal contraceptive insert by simulated coital activity. *Fertil Steril* 1979, 32:161-5.

17. Evans JP, Kopf GS. Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* 1998, 30:297-307.
18. Wassarman P, Jovine L, Litscher E. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* 2001, 3, 59-64.
19. D'Cruz OJ. Adhesión molecules in human sperm-oocyte interaction: Relevance to infertility. *Front Biosci* 1996, 1:161-76.
20. Evans JP. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays* 2001; 23:628-39.
21. Swanson W, Vacquier V. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics* 2002, 3, 137-144.
22. Swann K, Parrington J, Galione A, Shevchenko V, Lai F. Oscillin: an intracellular protein that triggers cytoplasmic Ca²⁺ oscillations. *Journal of Physiology* 1997, 499, 4S.
23. Terada Y, Nakamura SI, Hewitson L, Simerly C, Horiuchi T, Murakami T, Okamura K, Schatten G. Human sperm aster formation after intracytoplasmic sperm injection with rabbit and bovine eggs. *Fertil Steril* 2002 Jun, 77:1283-4.
24. Hewitson L, Simerly C, Schatten G. Cytoskeletal aspects of assisted fertilization. *Semin Reprod Med* 2000, 18:151-9.
25. Balakier H, MacLusky N.J, Casper R. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993, 59:359-65.
26. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997, 12:532-41.
27. Van de Velde H, De Vos A, Joris H, Nagy ZP, Van Steirteghem AC. Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998, 13:3160-4.
28. Edwards R.G., Purdy J.M., Steptoe P.C., Walters D.E. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1981, 141: 408-416.
29. Trounson A.O., Mohr L.R., Wood C., Leeton J.F. Effect of delayed insemination on IVF culture and transfer of human embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1981, 64: 285-294.
30. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001, 345:1400-8.
31. Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril* 1991; 55: 114-8.
32. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Ley Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994; 62: 497-506.
33. Nardo L, Bartoloni G, Diercurio S, Nardo F. Expression of alpha5beta3 and alpha4beta1 integrins throughout the putative window of implantation in a cohort of healthy fertile women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002,81:753-8.
34. Nikas G. Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Semin Reprod Med* 2000,18:229-35.
35. Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, Jones HW Jr. Surface morphology of the human endometrium. Basic and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:316-24.
36. Develioglou OH, Nikas G, Hsiu JG, Toner JP, Jones HW Jr. Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. *Fertil Steril* 2000, 74:767-70.
37. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Pinopode expression during human implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002,10,101:104-8.
38. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 2001, 76:782-91.
39. Bentin-ley U. Relevance of endometrial pinopodes for human blastocyst implantation. *Hum Reprod* 2000,15 Suppl:67-73.
40. Adams S, Gayer N, Hosie M, Murphy C. Human uterodomes (pinopods) do not display pinocytotic function. *Hum. Reprod* 2002,17: 1980-1986.
41. Murphy C. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: Pinopods—or uterodomes? *Hum. Reprod* 2000, 15: 2451-2454.

42. Lindhard A, Bentin-Ley U, Ravn V, Islin H, Hviid T, Rex S, Bangsboll S, Sorensen S. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertil Steril* 2002, 78:221-33.
43. Dominguez F, Pellicer A, Simon C. Paracrine dialogue in implantation. *Mol Cell Endocrinol* 2002, 25,186:175-81.