



SIMPOSIO: TECNOLOGÍA DE LABORATORIO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA SYMPOSIUM: LABORATORY TECHNOLOGY IN ASSISTED REPRODUCTION

RETROSPECTIVA DE LA TECNOLOGÍA DE LABORATORIO EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Resumen

Se revisa la secuencia evolutiva de la tecnología de laboratorio en reproducción asistida. Desde los primeros intentos de manipular embriones preimplantacionales recuperados de oviductos animales, en 1912, las transferencias directas o con breves periodos de incubación a madres receptoras, el complejo proceso bioquímico de preparación y suplementación de los medios de cultivo a partir de soluciones salinas químicamente definidas, la etapa de transición de esta tecnología a los humanos en la que se trabajó básicamente la maduración de ovocitos y la selección de espermatozoides motiles in vitro, hasta los procedimientos que culminaron con la primera aplicación clínica descrita en 1980.

Palabras clave: Tecnología de laboratorio, reproducción asistida, embrión pre-implantacional, medio de cultivo.

DR. GUILLERMO LLERENA-CANO^{1,2}

¹ Grupo PRANOR de Reproducción Asistida - Lima, Perú

Correo-e: gllerena@fertilidadperu.com

Rev Per Ginecol Obstet. 2011; 57: 8-12.

Retrospective on laboratory technology in assisted reproduction

ABSTRACT

We review the evolutionary sequence of laboratory technology in assisted reproduction. From the first attempts to manipulate preimplantational embryos recovered from animal oviducts in 1912; the direct transfers or with short incubation periods for receptor mothers; the complex biochemical process of preparation and supplementation of culture media from saline solutions chemically defined; the transition of this technology to humans basically in vitro oocyte maturation and selection of motile sperm; to proceedings ending with the first clinical application described in 1980.

Key words: Laboratory technology, assisted reproduction, embryo preimplantational, culture media.

La década de 1980 revolucionó el campo de la medicina reproductiva e introdujo un nuevo concepto en los tratamientos de infertilidad: la tecnología de reproducción asistida. Esta introducción hace una breve revisión secuencial sobre los procedimientos en modelos experimentales animales, que definieron los principios fisiológicos básicos para que esta nueva tecnología se estableciera en la medicina humana con la fortaleza y el éxito que hoy se traduce en el Premio Nobel que recibe Robert Edwards.

Hay referencias aisladas que informan que los primeros intentos de recuperar, observar y describir óvulos y embriones preimplantacionales de mamífero se habrían realizado revisando el contenido fluido de ovarios, oviductos y cuernos uterinos de pequeños murciélagos, roedores y conejos, desde

mediados del siglo XVIII y durante el siglo XIX. Los espermatozoides ya habían sido observados y descritos por Anton van Leeuwenhoek y otros microscopistas pioneros, en el siglo XVI.

De estas observaciones derivaron los primeros intentos de manipulación y un primer experimento de trasplante de un huevo fecundado en desarrollo (embrión) en conejos⁽¹⁾; fue realizado en el laboratorio de Walter Heape, en 1890, y publicado un año después en Londres, en la sección de Biología de Proceedings of the Royal Society. En su presentación, Heape observa que se trata de un reporte preliminar en el que se plantea la posibilidad de usar el útero de una variedad de conejo para el crecimiento y desarrollo fetal completo del huevo fecundado de otra variedad de conejo.



En los primeros años del siglo XX, las manipulaciones primarias se fueron orientando hacia la búsqueda del desarrollo embrionario extracorpóreo. Albert Brachet fue el pionero en experimentar con embriones de mamífero en cultivo. Logró mantener un blastocisto de conejo vivo y en desarrollo durante 48 horas fuera del cuerpo de la madre, en un medio de cultivo primario constituido por suero o plasma sanguíneo homólogo^(2,3). A finales de 1920, el mayor éxito en términos de duración del desarrollo in vitro era de Lewis y Gregory, quienes lograron filmar el desarrollo embrionario en conejo desde las etapas iniciales hasta blastocisto, sobre un portaobjetos de vidrio, usando el sistema óptico de un microscopio⁽⁴⁾.

A partir de 1932, ya era posible preparar una solución salina sustituta de plasma sanguíneo que demostraba buenos resultados en las pruebas bioquímicas y en los ensayos fisiológicos y farmacológicos. La versión más difundida estaba compuesta de 10 mM de D-glucosa, 0,5 de cloruro de magnesio, 4,5 de cloruro de potasio, 119,7 de cloruro de sodio, 0,7 de fosfato de sodio dibásico, 1,3 de fosfato de sodio monobásico, 15 de bicarbonato de sodio y debía funcionar a $\text{pH } 7,3 \pm 0,2$ y 270 ± 15 mOsm. La solución salina de Krebs Ringer bicarbonato⁽⁵⁾ no utilizaba calcio en su composición original y se basó en la convicción de que la concentración de iones en el plasma sanguíneo es casi idéntica en todas las especies de mamíferos y ha evolucionado para resistir los cambios de pH y presión osmótica de manera fisiológica. En 1933, Lewis y Hartman observaron y describieron el desarrollo del embrión del mono macaco, desde la fase de 2 células a la fase de 8 células⁽⁶⁾. Un poco más adelante, utilizando métodos similares y otros dispositivos experimentales (gota colgante, frasco de Carrel y vidrio de reloj en cámara húmeda), Gregory Pincus consigue resultados similares a los de Lewis con embriones de conejo, utilizando al inicio plasma y extracto de

embrión⁽⁷⁾, demostrando posteriormente que podían ser cultivados in vitro durante al menos dos días en medios de constitución química definida⁽⁸⁾. En este periodo, era inimaginable plantear estrategias experimentales válidas para el estudio de los embriones de mamíferos sin un medio suplementado con suero o plasma homólogo.

John Hammond Jr. fue el primero que comunica con éxito el cultivo de embriones de ratón a través de varias divisiones en una solución salina simple con cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y glucosa a una concentración de 1 mg/mL, suplementada al 5% con clara de huevo. En sus pruebas, la mayoría de embriones de ocho células e incluso algunos de cuatro células desarrolló en blastocistos⁽⁹⁾. Estos fueron resultados extraordinarios, teniendo en cuenta la solución simple que había usado, y lo autorizaban a proponer que una solución salina simple con proteína, calcio y glucosa era suficiente para la división de embriones de ratón durante varios días.

El mismo año de la publicación de los resultados de Hammond, un grupo de investigadores dirigidos por Christopher Polge consigue demostrar la posibilidad de utilizar la tecnología de crío-preservación de semen, sin que los espermatozoides mostraran cambios en sus patrones de motilidad al ser descongelados. Ellos congelaron semen de varias especies animales a -79°C , utilizando glicerol en el medio de crío-preservación⁽¹⁰⁾. Sus resultados demostraron, por primera vez, los efectos del glicerol sobre la integridad celular a temperaturas bajas, asignándole propiedades y particularidades como crío-protector.

En la década de 1950, el notable incremento en las publicaciones científicas en reproducción de mamíferos fue la evidencia del establecimiento de muchas nuevas líneas de investigación básica y aplicada, orientadas tanto a definir mecanis-

mos y bases fisiológicas de los fenómenos observados como a proyectar las aplicaciones de la nueva tecnología.

En 1951, dos investigaciones independientes explicaban la evidente necesidad de un cambio fisiológico en los espermatozoides de mamífero durante el paso por el tracto genital femenino, antes de adquirir la capacidad de fertilizar un óvulo^(11,12). En 1952, Colin Austin describe el término 'capacitación' como un cambio fisiológico en el espermatozoide, previo a la adquisición de la capacidad de penetrar un óvulo⁽¹³⁾ y, en 1953, se informa sobre el primer embarazo exitoso en humanos por inseminación con espermatozoides crío-preservados, usando hielo seco para la congelación y el almacenamiento del semen⁽¹⁴⁾.

En 1956, C. Adams demuestra que la solución de Krebs-Ringer bicarbonato suplementada con 0,2 % de albúmina sérica de bovino (BSA) fracción V puede ser utilizada para el cultivo de óvulos fecundados de conejo, durante dos días. El artículo propuso que las soluciones salinas simples serían las más adecuadas para estos cultivos⁽¹⁵⁾. El mismo año, Wesley Whitten, en el John Curtin School of Medical Research, en Canberra, confirma los resultados de los trabajos clásicos con embriones de ratón de Hammond, en 1949, usando un medio con proteína de clara de huevo; pero, encuentra además que el Krebs-Ringer bicarbonato proporciona un mejor control del pH y que la clara de huevo podía ser reemplazada adecuadamente con BSA⁽¹⁶⁾. Sus resultados demostraron que los embriones de ratón de ocho células pueden desarrollar en un entorno de constitución química definida, pero no consigue el mismo resultado con los embriones de dos células.

Dos años después, Anne McLaren y Jhon Biggers, trabajando en el Royal Veterinary College, en Londres, contribuyen notablemente con el desarrollo de las técnicas de cultivo

en condiciones controladas. Estudiando el desarrollo de embriones preimplantacionales de ratón transferidos a madres receptoras logran los primeros nacimientos a partir de embriones cultivados in vitro ⁽¹⁷⁾.

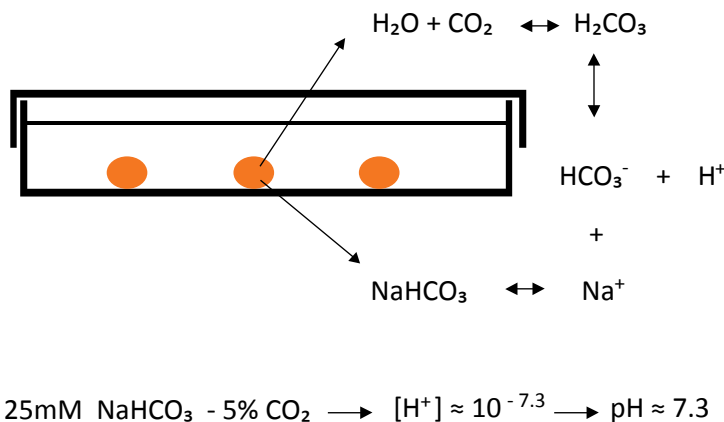
Los primeros nacimientos por fecundación in vitro fueron conseguidos por Min Chueh Chang, en 1959. Los resultados de su trabajo mostraron 266 óvulos recuperados de ovarios de coneja, 55 (21%) fecundados y con desarrollo normal in vitro, 36 transferidos a hembras receptoras y 15 (42%) nacidos vivos ⁽¹⁸⁾.

Hacia 1962, Robert Edwards desarrollaba estudios sobre la maduración in vitro de ovocitos de varias especies, incluyendo ratas, hámsteres, cerdos, vacas, ovejas, ratones, primates y humanos ⁽¹⁹⁾, utilizando principalmente el medio 199, complementado con un 15 por ciento de BSA y antibióticos.

Por la misma época, y después de muchas pruebas, el cultivo de embriones en microgotas de medio bajo una capa de aceite de parafina en una placa de Petri de 60 mm, demostró ser superior a todos los otros métodos descritos ⁽²⁰⁾ y progresivamente se fue convirtiendo en el sistema utilizado universalmente. De manera paralela, los medios de cultivo siguieron evolucionando y el mismo año se dio inicio a las pruebas cultivando embriones con la versión F-10 que R. Ham había desarrollado para cultivar líneas celulares diploides humanas y de hámster sirio ⁽²¹⁾. El medio basado en una solución salina con buffer bicarbonato-anhídrido carbónico (atmosférico) tenía glucosa y piruvato de sodio como fuentes de energía y estaba suplementado con aminoácidos, vitaminas y precursores de nucleótidos (figura 1).

La concentración de solutos e incluso la propia composición original de las soluciones salinas simples fue sucesivamente modificada por diferentes investigadores, en búsqueda

Figura 1. Balance iónico en el buffer bicarbonato – anhídrido carbónico (atmosférico) en solución acuosa.



de un balance iónico o una fuente de precursores metabólicos ideal para los nuevos modelos experimentales (figura 2). El concepto de que el espermatozoide de hámster podía ser capacitado in vitro en un medio químicamente definido deriva de los trabajos de Riuzo Yanagimachi y Min Chue Chang en fecundación de ovocitos de hámster con espermatozoides epididimarios ⁽²²⁾.

En 1964, R. Edwards publica sus resultados de clivaje de embriones de conejo sin zona pelúcida en di-

ferentes medios de cultivo, entre los que prueba el medio F-10 de Ham ⁽²³⁾ y, durante la serie de pruebas realizadas hasta 1965, fue capaz de determinar que la secuencia de tiempo de maduración in vitro, como lo es in vivo, es relativamente constante y específica para una especie determinada, pero que existe una considerable variación entre las especies ^(24,25).

Durante 1965, Ralph Brinster publica una serie de artículos que analizaban los fundamentos metabólicos del cultivo preimplantacional del

Figura 2. Composición de las soluciones químicamente definidas precursoras de los primeros medios de cultivo para embriones de mamífero.

Compuesto (m M)	Locke	Tyrode	Krebs	Eagle	Brinster	BWW
D-glucosa	5,6	5,0	10,0	5,6	5,6	5,6
Piruvato de sodio	-	-	-	-	0,3	0,3
Lactato de sodio	-	-	-	-	25,0	21,6
Lactato de calcio	-	-	-	-	-	1,7
Cloruro de magnesio	1,0	1,5	0,2	-	-	-
Sulfato de magnesio. 7 H ² O	-	-	-	0,8	1,2	1,2
Cloruro de calcio	2,3	1,8	-	1,8	1,7	-
Cloruro de sodio	130,0	136,9	119,8	116,4	94,9	68,5
Cloruro de potasio	5,6	5,0	4,6	5,4	4,8	4,8
Bicarbonato de sodio	10,0	11,9	15,0	26,2	25,0	25,7
Fosfato dibásico de potasio	-	-	-	0,7	1,2	1,2
Fosfato dibásico de sodio	-	-	0,4	0,7	-	-
Fosfato monobásico de sodio	-	-	-	1,3	-	-
Albúmina sérica de bovino (%)	-	-	-	-	0,1	0,4



embrión de ratón. Tomando como base la solución de Krebs-Ringer bicarbonato y la solución salina balanceada de Eagle, prepara un medio de cultivo en el que disminuye la concentración de cloruro de calcio a 1.71 milimolar (mM) y, luego de examinar la regulación de los procesos metabólicos del embrión, particularmente su dependencia del piruvato más que de la glucosa como fuente energética, incluye concentraciones de piruvato de sodio de 0,25 a 0,5 mM. Otro resultado de estos estudios fue consecuencia de haber descubierto que la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa era muy alta en los embriones de muchas especies, lo que podía asegurar la rápida oxidación del lactato de origen extracelular en piruvato intracelular. Esto determina la inclusión de 25 mM de lactato de sodio en su medio de cultivo, suplementado con 0.1% de BSA⁽²⁶⁻³⁰⁾. Pocos años después, Biggers, Whitten y Whittingham cambiarían el cloruro de calcio por 1.71 mM de lactato de calcio, incrementando la concentración de lactato y, además, aumentaron a 0,4% la concentración de BSA en su medio BWW, con excelentes resultados en el cultivo de embriones preimplantacionales de ratón.

En 1966, Robert Edwards y Roger Donahue conformaban un grupo que continuaba intentando la maduración de ovocitos humanos in vitro, pero se enfrentaban por un lado a requisitos de cultivo muy exigentes y por otro a la reducida cantidad de folículos de tamaño adecuado que conseguían. Más aun, los pocos ovocitos que maduraban tenían dificultades para fecundar in vitro⁽³¹⁾. Estos trabajos continuaron durante varios años, probando con medios de cultivo de diferente complejidad y encontrando únicamente que la tasa de maduración era un poco más alta en el medio Ham F-10, comparado con el TC 199 y la solución salina de Krebs-Ringer⁽³²⁾.

Las pruebas para aislar espermatozoides epididimarios motiles

de toro a partir de un sedimento obtenido por centrifugación y colocado en la base de un tubo de espermatocrito bajo medio de cultivo⁽³³⁾ sirvieron de fundamento para desarrollar en 1976 la técnica de *swim-up*, que fue la primera con la que se logró seleccionar una fracción de espermatozoides humanos móviles, libre de plasma seminal y de otros componentes del eyaculado⁽³⁴⁾.

Por su parte, y luego de cambiar los protocolos de tratamiento hormonal para estimulación ovárica, R. Edwards y P. Steptoe consiguen un primer embarazo exitoso en 1976. Desafortunadamente, el embrión se había implantado en la trompa de Falopio y el embarazo tuvo que ser terminado⁽³⁵⁾. Finalmente, el 25 de julio de 1978, logran el primer nacimiento por fecundación in vitro y transferencia embrionaria, en Oldham, Inglaterra⁽³⁶⁾. Los detalles clínicos y embriológicos del procedimiento fueron publicados por separado, en 1980. La experiencia inicial con ciclos no estimulados produjo en promedio 0,7 ovocitos por recuperación y en general una tasa de embarazo de 6% por ciclo iniciado (4/65)⁽³⁷⁾. Los cuatro embarazos y los dos bebés nacidos vivos marcaron el inicio de un rápido desarrollo en la investigación y en la aplicación clínica de la técnica para el tratamiento de la infertilidad humana, dando lugar al inicio de la era de la tecnología de reproducción asistida y, ante la creciente necesidad de estandarizar los protocolos y criterios de diagnóstico, el mismo año se publica la primera edición del Manual de la OMS para el examen de semen humano y las interacciones entre los espermatozoides y el moco cervical⁽³⁸⁾.

La aplicación y desarrollo de esta tecnología en el Perú comenzó en 1989, a partir de los trabajos de L. Prazak, L. Noriega y G. Llerena y es revisada y actualizada en los siguientes artículos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heape W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proc R Soc Lond [Biol]. 1891;48:457-8.
2. Brachet A. Développement in vitro de blastomeres et jeunes embryons de mammifères. CR Acad Sci Paris. 1912;155:1191-4.
3. Brachet A. Recherches sur le déterminisme héréditaire de l'oeuf des mammifères. Développement in vitro de jeunes vesicules blastodermiques du lapin. Arch Biol. 1913;28:447-52.
4. Lewis WH, Gregory PW. Cinematographs of living developing rabbit eggs. Science N.Y. 1929;69:226-9.
5. Krebs HA, Henseleit K. Studies on urea formation in the animal organism. Hoppe-Seylers Z. Physiol Chem. 1932;210:33-66.
6. Lewis WH, Hartmann CG. Early cleavage stages of the egg of the monkey (*Macacus rhesus*). Contrib Embryol (Carnegie Inst Wash). 1933;24:187-201.
7. Pincus G, Enzmann E. Can mammalian eggs undergo normal development in vitro? Proc Natl Acad Sci. 1934;20:121-4.
8. Pincus G, Werthessen NT. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. III. Factors controlling the growth of the rabbit blastocyst. J Exp Zool. 1938;78:1-7.
9. Hammond J Jr. Recovery and culture of tubal mouse ova. Nature. 1949;163:28-9.
10. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature (London). 1949;164(4172):666.
11. Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into mammalian egg. Australian J Scient Res B. 1951;4(4):581-96.
12. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. Nature (London). 1951;168:697.
13. Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. Nature (London). 1952;170:326.



14. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*. 1953;172:767-8.
15. Adams CE. Egg transfer and fertility in the rabbit. *Third Int. Congr. Anim. Reprod., Cambridge, Section*. 1956;3:5-8.
16. Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature*. 1956;177:96.
17. McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos. *Nature*. 1958;182:877-8.
18. Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*. 1959;184:466-7.
19. Edwards RG. Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature*. 1962;196:446-50.
20. Brinster RL. A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp Cell Res*. 1963;32:205-8.
21. Ham RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp Cell Res*. 1963;29:515-26.
22. Yanagimachi R, Chang MC. In vitro fertilization of the golden hamster ova. *J Exp Zool*. 1964;156:361-76.
23. Edwards RG. Cleavage of one- and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of the zona pellucida. *J Reprod Fertil*. 1964;7:413-5.
24. Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 1965;208:349-51.
25. Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*. 1965;2:926-9.
26. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J Exp Zool*. 1965a;158:49-57.
27. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro II. The effect of energy source. *J Exp Zool*. 1965b;158:59-68.
28. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro III. The effect of fixed-nitrogen source. *J Exp Zool*. 1965c;158:69-77.
29. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro IV. Interaction of energy sources. *J Reprod Fertil*. 1965d;10:227-40.
30. Brinster RL. Lactate dehydrogenase activity in the preimplanted mouse embryo. *Biochim Biophys Acta*. 1965e;110:439-41.
31. Edwards RG, Donahue RP, Baramaki TA, Jones HW. Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol*. 1966;1:1163.
32. Kennedy JF, Donahue RP. Human oocytes: Maturation in chemically defined media. *Science*. 1969;164:1292-3.
33. Drevius LO. The "sperm-rise" test. *J Reprod Fert*. 1972;24:427-32.
34. Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril*. 1976;27:677-84.
35. Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet*. 1976;1:880-2.
36. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2:366.
37. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol*. 1980;87:737-56.
38. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 1st edn. Press Concern, Singapore. 1980.