

## Reproducción asistida: ciencia en avance continuo

Consuelo Serres Dalmau, Profesora Contratada Doctor, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

La reproducción asistida o biotecnología de la reproducción comprende todas aquellas técnicas que permiten aumentar la eficiencia reproductiva en una especie.

Incluye desde las técnicas más tradicionales como la inseminación artificial como otras más modernas y complejas como la clonación.

A través de los años, los científicos han avanzado las técnicas de manipulación y aplicación de técnicas que ayuden a la mejora reproductiva en las diversas especies desarrollando tecnologías como la inseminación artificial, la sincronización del celo, la superovulación, la transferencia de embriones y la fertilización in vitro. Y en épocas más recientes, han aparecido tecnologías como la producción de embriones in vitro a través de la FIV y del ICSI, la criopreservación y la selección del sexo de embriones y de espermatozoides e incluso, diagnóstico genético preimplantacional, la clonación y la transgénesis.

Hay que tener en cuenta que para el desarrollo de todas ellas se han tenido que ir desarrollando y mejorando otras técnicas para conseguir su éxito o aplicación, como la superovulación y la hiperestimulación folicular necesarias, complementarias y que hacen eficiente una transferencia de embriones, la colecta y maduración de ovocitos o el cultivo embrionario

Lo primero que tenemos que tener en cuenta es que toda ciencia se va desarrollando según las necesidades que el hombre se va encontrando, por ello el desarrollo de la reproducción asistida ha tenido diferente evolución entre el humano y los animales.

Comencemos con el humano, desde el principio de la historia las técnicas de reproducción asistida han ido surgiendo cuando se ha tratado de combatir la infertilidad. En casi todas las culturas el problema de infertilidad-esterilidad tenían un impacto sociocultural muy importante, incluso siendo considerada por algunos grupos como un castigo divino.

En el antiguo Egipto, la infertilidad no se consideraba así, sino una enfermedad que debía ser diagnosticada y tratada. Dejaron escritos los primeros tratados médicos de los que hay constancia, entre los que destaca el papiro Kahoun, el texto médico más antiguo conocido, y quizás también, el primer tratado de ginecología datado hacia el año 1.900 a.C. Los egipcios fueron precursores en el intento por alcanzar la predictibilidad de los problemas de la fertilidad y del primer test de embarazo.

En Mesopotamia, los aztecas usaban propiedades aromáticas de árboles ornamentales, y por su utilidad contra la esterilidad femenina.

Lo que nos demuestra que desde épocas muy tempranas en la historia de la humanidad se ha intentado dar explicación a la realidad clínica de la fertilidad.

La reproducción asistida más avanzada como no dio sus frutos hasta el siglo pasado a finales de los años 70 y se desarrolló exponencialmente en los años 90.

En la actualidad las técnicas de reproducción asistida se adaptan a los nuevos perfiles de pacientes para solucionar sus problemas de una forma personalizada, ya que nos

encontramos ante una sociedad dinámica donde los modelos de familia tradicional están cambiando y la maternidad se está retrasando considerablemente.

En otra faceta completamente diferente es el desarrollo científico de la reproducción en los animales donde el interés generalmente está enfocado a obtener los mejores animales en el menor tiempo posible y también en modificar sus genes con el fin de mejorar sus productos, hacerles resistentes a ciertas enfermedades o incluso producir fármacos con usos terapéuticos.

Pero también utilizadas de manera concreta en determinadas circunstancias, han ayudado y pueden ayudar a la preservación de especies muy amenazadas. Su aplicación a especies tales como rinocerontes blancos, delfines, gorilas, belugas, osos, pandas gigantes, orcas y lince por ejemplo con la creación de bancos de germoplasma permite la preservación de los materiales de alto valor genético.

Por todo ello y como veremos a lo largo de la conferencia la evolución del desarrollo de las diferentes técnicas han ido con diferente progresión y diferentes objetivos en el humano y en los animales, y también entre las diferentes especies animales.

De la primera técnica de la que vamos a hablar es de la Inseminación Artificial.

## INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

Desde 2.000 años antes de Cristo existen hallazgos que hacen sospechar que había conocimiento de inseminación artificial. En la civilización Sumeria se han encontrado hallazgos que ponen de manifiesto sus conocimientos de inseminación y hacen referencia a inseminaciones en ovejas y cabras.

También existe una cita que data del siglo XIV donde se cuenta que un jefe árabe robó el semen de un caballo famoso de uno de sus enemigos colocando una esponja en una yegua que iba a ser cubierta por ese semental, introduciendo después esta esponja en la vagina de una yegua de su propiedad quedando gestante.

Y en el caso de los humanos hay testimonios de que ya en el siglo XV (1461) la inseminación artificial fue realizada por un médico Judío (llamado Sumaya Lubel) a la Reina Juana de Portugal mediante una cánula intravaginal (de oro), la reina estaba casada con Enrique IV de Castilla también conocido como “el impotente” de dicha inseminación nació la princesa Juana. Aunque también es cierto que el escepticismo de la época y los fuertes dogmas religiosos llevaron a todas las personas a afirmar una supuesta infidelidad de la princesa y la princesa siempre llevó el sobrenombre de “La Beltraneja”

En realidad el primer reconocimiento científico como el pionero de la inseminación artificial fue a Lazaro Spallanzani en 1784 que fecundó una perra en celo con espermatozoides procedente de un macho, obteniéndose una camada de cachorros normales con las características de sus progenitores.

Pero ya anteriormente había tomado huevos vírgenes de ranas y los puso en contacto con el líquido seminal, logrando la fecundación de los primeros. Vigiló cuidadosamente el proceso que siguió a la fecundación, desde el desarrollo hasta el nacimiento de las larvas surgidas. Este experimento es de la mayor importancia, ya que se puede considerar como el primer trabajo sobre fecundación (o inseminación) artificial realizado a partir del método experimental.

Y gracias a esto fue que el cirujano inglés Hunter quien realiza la primera inseminación artificial reconocida por la ciencia en humano en el año 1785, (anatomista y cirujano escocés) en un paciente que padecía de "hipospadia". Durante este procedimiento se

utilizó una jeringa previamente esterilizada en caliente, luego de estar apta para alojar el semen se utilizó para hacer llegar el mismo hasta el útero de la mujer. Este procedimiento dio como resultado un bebé fuerte y sano.

Desde entonces fueron descritos varios estudios aislados en diferentes especies (conejos, perros y caballos) centrándose en el ganado equino según cuenta Repiquet 1885 por interés económico de transporte y seguridad.

Sin embargo los esfuerzos para desarrollar técnicas modernas de inseminación artificial comenzaron en Rusia en 1899 con Ivanoff, también en caballos.

Pero es cuando se inventó la vagina artificial en 1914 por Amantea, cuando esta técnica empieza a extenderse en Europa, sobre todo en Rusia, país en el que como consecuencia de la revolución precisaba reponer su ganadería que había quedado muy mermada.

Desde 1930 a 1960 se inseminaron 600.000 yeguas entre Rusia y China, desde entonces no se ha dejado de avanzar. En 1980 en Rusia Ivanoff inició en gran escala la IA en equinos, vacunos y ovino.

La inseminación artificial en animales se usó principalmente para incrementar la mejora genética aprovechando un solo eyaculado para inseminar varias hembras. Siendo estas mejoras conseguidas muy notables. También con el uso de la inseminación artificial se ha conseguido la regresión de genes letales recesivos y un mejor control sanitario de transmisión de ciertas enfermedades venéreas.

A mediados de los años setenta, las técnicas de inseminación artificial eran rutinarias en las explotaciones vacunas más modernas de Europa y hoy en día pocas son las granjas que empleen la monta natural en vez de la inseminación artificial, aunque en otras especies domésticas, su uso no ha sido tan intensivo.

Por otro lado, ginecólogos de los años 70 comprendieron las enormes posibilidades de aquellos métodos de inseminación artificial para resolver problemas de fertilidad en el hombre y comenzaron a trabajar en conjunto científicos especializados en esta técnica.

Sin embargo y a pesar de que la inseminación artificial ha estado presente a lo largo de la historia en reproducción humana, ayudando a miles de parejas con problemas reproductivos, actualmente se ha estancado y se aplica en casos muy concretos, sobre todo debido al mayor éxito alcanzado con otras técnicas.

De hecho hay un cierto paralelismo entre la inseminación artificial en el humano y el cuento de la cenicienta. Ya que la tasa de éxito es mayor cuanto más jóvenes son los óvulos de la mujer. Esto es IA si pero antes de los 38 o la carroza se convertirá en calabaza.

## CONSERVACIÓN DE SEMEN

La primera referencia de que es el semen se podría conservar fue cuando Spallanzani dejó semen en nieve comprobando que los espermatozoides no morían, se volvían inmóviles pero al ponerlos de nuevo en calor recuperaban su motilidad.

En 1939 se describió el primer diluyente con yema de huevo y en 1949 fue el primer uso del glicerol como crioprotector. Congelando con éxito semen de pollo Polge aunque al principio no sabía que era glicerol probablemente equivocaron el etiquetado pensando que solo era fructosa, fue en réplicas posteriores donde fueron conscientes de este hecho.

En 1950 surge la idea de añadir antibióticos al semen para prevenir enfermedades venéreas. Y también se cambió la congelación en Hielo seco por la congelación en

nitrógeno líquido, para esta fecha la inseminación artificial se convirtió en una industria establecida:

El semen bovino congelado en nitrógeno líquido (-196 °C) ha permitido su almacenamiento por largos períodos (el más antiguo desde 1952 a la fecha) sin que se produzca un deterioro en la fertilidad del mismo. Gracias a ello el semen (y la genética en él contenida) se conserva, se transporta y se utiliza en muy diversos ambientes.

Frosti fue el primer ternero nacido de este semen congelado en 1952

En 1956 Harrop obtuvo un parto de una perra inseminada en EEUU con semen de Gran Bretaña y en 1969 Seager en EEUU obtiene la primera camada de semen canino congelado.

Al final del siglo 20 la inseminación intrauterina profunda en cerda y en la yegua han conseguido aumentar índices de éxito y sobre todo disminuir la dosis inseminante en dándole efectividad a la técnica.

Tradicionalmente se usaban 500 millones mótiles de espermatozoides equinos por inseminación, la dosis actual es de 100 o 200 y en algunos ejemplares se ha podido bajar la dosis hasta los 50 millones de espermatozoides

En caballos la primera referencia de este tipo de inseminación se comenzó realizando con endoscopia intrauterina, y aunque en la actualidad se sigue utilizando; el desarrollo de catéteres flexibles que se pueden guiar mediante palpación rectal hasta la unión uterotubárica ha permitido expandirse esta técnica de inseminación en caballos que se ya usa sobre todo con semen congelado a nivel clínico de forma mundial.

## SEXAJE DE SEMEN

Si fuera posible separar los espermatozoides X e Y sin destruir muchas células espermáticas y sin reducir la fertilidad, sería el sueño irrealizable de las empresas de inseminación artificial, porque existe un enorme interés económico en seleccionar el sexo de la descendencia para aumentar la eficacia reproductiva. Éste es uno de los objetivos más perseguidos en los últimos 50 años.

Se han probado muchos sistemas de separación espermática para la selección del sexo.

Que se pueden dividir en dos según su mecanismo de actuación:

-Aquellos que intentan separar espermatozoides sobre la base de sus características físicas o cinéticas o fraccionamiento sobre columnas de albúmina, o filtración con sephadex, o separación electroforética o Antígeno H-Y

-Aquellos que actúan sobre las diferencias nucleares de los espermatozoides que transportan el cromosoma "X" o el "Y".

El método que ha demostrado más efectividad es la separación espermática con citometría de flujo.

Hace ya veintiséis años que Johnson et al. (1989) reportó la primera camada nacida viva producida a partir de espermatozoides sexados

El núcleo del espermatozoide que transporta el cromosoma X es más grande y contiene una mayor cantidad de ADN que el espermatozoide que transporta el cromosoma Y. En la especie humana esta diferencia es de 2,8%, en espermatozoides de verraco es de 3,4% y en espermatozoides de macho cabrío es de 4,2. La mejora con los años en los aparatos de citometría de flujo ha permitido, poder separar realmente esos espermatozoides que contenían una mayor cantidad de ADN y así establecer poblaciones de espermatozoides

bien caracterizados y diferenciados. Y aunque en bovino existe la posibilidad comercial del mismo, el semen sexado no es lo más habitual.

En otras especies como en el caballo o porcino no se han conseguido un protocolos suficientemente eficientes siendo un proceso lento que daña mucho los espermatozoides y esta especie en particular aún se necesitan muchos espermatozoides vivos por inseminación.

Se están intentando desarrollar sistemas más económicos y rápidos y con menor necesidad de equipamiento para el sexaje de semen uno de los más modernos es el uso de nanopartículas. Que se ha evaluado en varias especies, en bovino se prueban nanopartículas de oro y en el équidos mediante nanopartículas magnéticas los cuales han demostrado no tener ningún perjuicio sobre la calidad de los espermatozoides, obteniendo porcentajes de fertilidad similares al semen no procesado.

La utilización de nano-partículas magnéticas es un método eficaz de separación de espermatozoides que contienen el cromosoma X de los que tienen el cromosoma Y confirmado por la prueba de FISH, Citometría De Flujo y qPCR con promedios sobre 90%. La viabilidad espermática, no se vio afectada por la utilización de estas NP y su interacción con los espermatozoides equinos durante el proceso de sexado. La motilidad total y progresiva evaluada por sistema de análisis computarizado AndroVision® no mostró diferencias entre grupo control y sexado tanto antes como después del proceso de congelación. Los parámetros de Motilidad, VSC, VSL, VAP, Capacitación y PY no mostraron diferencias entre semen control y sexado después de la congelación. El parámetro de fragmentación de ADN si mostro un mayor nivel de fragmentación en el grupo sexado según la prueba de selección espermática. En los ensayos preliminares in vivo, el semen sexado utilizando NP magnéticas mantuvo su capacidad fertilizante y no generó pérdidas gestacionales tempranas. La proporción del sexo hembra logrado en las gestaciones se mantiene sobre el 90% utilizando las nanopartículas magnéticas como medio de separación espermática.

## TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

La transferencia de embriones obtiene un mayor rendimiento en las hembras. Esta técnica permite que una hembra en vez de invertir meses en el nacimiento de cada cría, el embrión sea transferido a una receptora y que la gestación de cada embrión sea llevada por ellas. Así la hembra donante pueda seguir produciendo embriones en cada ciclo. En el caso de especies donde la hiperestimulación ovárica o superovulación sea efectiva esta técnica incrementaría en eficacia exponencialmente.

Esta técnica fue descrita por primera vez en 1890 cuando se realizó la primera transferencia embrión con éxito y fue en conejo por Walter Heape (Cambridge).

Poco a poco se fue describiendo la técnica en otras especies naciendo el primer ternero en 1951 y en los años 70 en equinos.

El desarrollo de protocolos de superovulación, de sistemas de lavado uterino para la obtención de embriones no quirúrgicos, así como sistemas de transferencia de embriones transcervical en vacuno hicieron que esta técnica pasara de realizarse de forma puntual o experimental a realizarse a gran escala y con fines comerciales.

Desde los años 90 esta técnica se realiza de forma rutinaria en muchas especies, como por ejemplo en el bovino donde se realizan más de medio millón de embriones bovinos anuales en el mundo, y en menor medida en el resto de especies: más de quince mil en equinos y porcino y menor numero en ovino y caprino.

Hay que destacar que los estudios interespecies con transferencia de embriones han aportado a la ciencia la mayoría de los conocimientos actuales de reconocimiento maternal de gestación y desarrollo intrauterino (1971 burro-caballo, 1984 cebra-caballo)

## FECUNDACIÓN IN VITRO

Muchos años de investigación en embriología animal sobre producción de embriones in vitro se vieron impulsadas por el primer nacimiento mediante fertilización in vitro en humanos en 1978.

El nacimiento del primer bebé probeta fue en el Reino Unido en 1978, una bebé llamada Louis Brown, conseguido por los doctores P. Steptoe y Robert G. Edwards.

Años más tarde fue el primer ternero de FIV, por Ben Brackett y sus colegas en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pennsylvania en junio de 1981.

Y en 1983 y 84 el primero en porcino y ovino respectivamente.

Esta técnica se impuso de forma comercial en humana, y en España se realiza desde los años 80.

Desde esas fechas en muchos laboratorios del mundo se ha trabajado en fecundación in vitro tanto en la especie humana como en animales. La metodología para conseguir la fecundación in vitro es la siguiente:

- Maduración de los oocitos in vitro, realizándose los primeros trabajos con oocitos postovulatorios.
- Capacitación in vitro de los espermatozoides, bien procedentes de semen fresco o de semen congelado.
- Inseminación in vitro de los oocitos madurados en el laboratorio con el semen capacitado en el laboratorio. El tiempo de inseminación varía dependiendo de la especie animal de que se trate.
- Cultivo in vitro, con una duración variable y dependiendo de dónde se realice la transferencia de embriones: en el oviducto (hasta el estadio de mórula), y en cuerno uterino (mórula o blastocisto).
- Transferencia de los embriones producidos in vitro, bien a hembras receptoras o bien se congelan y son almacenados en los bancos de embriones para su posterior transferencia.

Dependiendo de la especie animal, los resultados son muy variables, si bien en ovejas y vacas la fecundación in vitro funciona bien en la cerda, durante muchos años ha presentado un gran problema como ha sido la polispermia en la fecundación.

O como por ejemplo el caballo donde solo hay reportes esporádicos ya que su eficiencia es casi nula y de hecho solo se conocen el nacimiento de dos potro por esta técnica (Palmer 1991; Bezard 1992)

Por otro lado, en bovinos, apenas entre 20 y 50% de los ovocitos fertilizados in vitro, terminan siendo embriones viables, variando la tasa de fertilidad de estos embriones entre 30 y 40%, hecho sin duda vinculado con una alta mortalidad embrionaria reportada durante los primeros 30 d de gestación. Muchas de las crías provenientes de embriones producidos in vitro exhiben un peso al nacimiento superior a lo esperado, produciendo el conocido “síndrome del becerro gigante”, siendo común, que su nacimiento sea a través de una operación cesárea.

En general los resultados de maduración, fecundación y cultivo in vitro de embriones, dejan mucho que desear, porque no se superan unas cifras de nacimientos de animales superiores al 40%; por lo tanto, aún hoy en día hay que mejorar, bien la maduración de los oocitos in vitro, la fecundación y el cultivo in vitro. En la especie humana en los últimos años se han incrementado mucho los porcentajes de gestaciones, hasta un 32% porque se ha mejorado la técnica. La modificación consiste en transferir embriones más desarrollados en estadio de 8 células o mórulas al útero, después de muchos años ver que un embrión en estadio de 2 células sufre mucho cuando se transfiere al útero.

#### INSEMINACION INTRACITOPLASMÁTICA.

La primera inyección espermática con éxito, se desarrolló mediante la microinyección de espermatozoides de erizo de mar en huevos de la misma especie (Hiramoto, 1962).

Posteriormente a Uehara y Yanahimachi (1976), al trabajar con hámster, se les atribuye el primer experimento de ICSI en mamíferos.

Sin embargo no fue hasta 1988 cuando se obtuvo por primera vez descendencia viva como producto de ICSI en conejos (Hosoi y cols., 1988) y dos años más tarde se consiguió el nacimiento de terneros vivos (Goto y cols., 1990).

Catt y cols., (1996) obtuvieron el primer cordero macho producto de fecundar por ICSI, con un espermatozoide sexado, un ovocito madurado in vitro.

En ICSI en caballos la primera publicación es del doctor Squires en 1996 y desde 2003 se oferta de forma comercial en todo el mundo aunque son pocos los laboratorios con buenos resultados

La inyección de un solo espermatozoide en el interior del citoplasma del ovocito, la microinyección espermática o ICSI (Intra-Citoplasmic Sperm Injection), supuso un gran avance para el tratamiento de la esterilidad de origen masculino en el hombre, desde que en 1992 (Gianpiero Palermo) tuviera lugar el primer nacimiento de un niño por esta técnica su desarrollo y uso se ha extendido en esta especie de manera mundial.

En algunas especies animales se comenzó usando para combatir los problemas de poliespermia que se encontraban en la FIV tradicional y en otras por la baja efectividad de la FIV.

Relacionado con la esterilidad masculina esta técnica ha ido desarrollándose y consiguiendo bebés sanos con inyección de espermatozoides extraídos de testículo o epidídimo. (TESE, TESA, PESA, MESA)

Con la inyección de células redondas (Tesarik y cols. 1995) se abrieron nuevas perspectivas al conseguir las primeras gestaciones y nacimientos tras la inyección (mediante ICSI) de espermátidas.

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

#### MEJORA DE LAS TECNICAS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO

A partir de los años 80, los esfuerzos se centraron en poner en marcha protocolos de estimulación ovárica más efectivos, desarrollar técnicas de criopreservación de ovocitos

y embriones y realizar los primeros ciclos de donación de gametos. Se mejoraron los sistemas de selección espermática, se desarrolló el diagnóstico genético preimplantacional y se han mejorado los sistemas de evaluación y selección embrionaria no invasivos.

## CRIOCONSERVACIÓN DE GAMETOS.

Todas las técnicas descritas desde la IA, la transferencia de embriones, la fecundación in vitro, el ICSI e incluso la determinación del sexo, dependen sobre todo de la capacidad de mantener la viabilidad del semen, ovocitos y embriones durante un tiempo variable que puede ser desde horas hasta años fuera del aparato genital femenino, asegurando su posterior desarrollo.

La congelación de oocitos resultó ser, en sus inicios, técnicamente más problemática de lo esperado. El oocito maduro se encuentra en una fase de la división celular en la que el aparato microtubular que dirige el correcto reparto de los cromosomas a las células hijas tras la fecundación está ya formado, y es muy sensible a los cambios de temperatura. Por esta razón, resultaron negativos los primeros intentos de congelación de oocitos, ya que la célula no sobrevivía a la congelación o, en caso de hacerlo, se afectaba su aparato microtubular, dando lugar a la formación de blastómeros cromosómicamente anormales.

La congelación de embriones mamíferos se inició en 1972 con base en los estudios experimentales de Wilmut y Whittingham quienes mostraron que el enfriamiento lento de embriones de ratón en etapas tempranas de división, a temperaturas por abajo de los 0° C en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO), y su calentamiento lento durante la fase de descongelamiento, producía una buena supervivencia embrionaria y el desarrollo a término. Trounson y Mohr criopreservaron por primera vez embriones humanos de manera satisfactoria usando una variación del método antes descrito y con ello se introdujo la criopreservación de embriones en los programas de la fecundación in vitro.

1974 ovino

1982 primer potro embrión equino congelado

El primer nacimiento de un bebe tras criopreservación y descongelación de un embrión fue en 1983 (equipo australiano dirigido por Trounson y Mohr).

Durante las últimas décadas se ha probado un sistema de congelación ultra rápida llamada vitrificación cuya efectividad en ovocitos y embriones humanos ha optimizado considerablemente la eficacia de la producción de embriones in-vitro.

La vitrificación difiere de la congelación tradicional en la velocidad mucho más lenta y controlada de esta última, introduciendo la muestra en un congelador automático o exponiéndola a vapores de nitrógeno líquido y controlando la curva de enfriamiento.

En la vitrificación sin embargo las células se ponen en contacto directo con el nitrógeno líquido y el proceso de congelación es prácticamente inmediato.

En el proceso de vitrificación sólo se usan crioprotectores no permeables a dosis muy elevadas que hacen que, al introducir la muestra en nitrógeno líquido, se cree una sustancia viscosa que no se congela, y no produce cristales de hielo ni intra ni extra celulares que si se producen en el descenso paulatino de la temperatura de la congelación lenta.

Estos cristales de hielo dañan las membranas celulares provocando daños importantes que disminuían los índices de fecundidad.

Otra de las ventajas es que la vitrificación es un procedimiento más simple, que no necesita de equipos costosos y requiere poco tiempo para su realización.

Sin embargo, presenta inconvenientes como ha sido que se necesita contacto directo con el nitrógeno y poca cantidad de fluido para vitrificar por lo que encontrar sistemas de congelación y almacenamiento para estas muestras y que aseguraran el aislamiento del resto de las muestras del tanque ha llevado sus años de desarrollo.

Dentro de los principales sistemas de empaque desarrollados se encuentran: el tamaño mínimo de la gota (MDS) (Arav 1992), las rejillas para microscopía electrónica (EM) (Martino et ál. 1996), las pajillas estiradas abiertas conocidas como open-pulled straws (OPS) (Vajta et ál. 1998), las asas para congelación o cryoloops (Lane et ál. 1999), el volumen mínimo de congelación (MVC) (Hamawaki et ál. 1999), el sistema de hemipajilla (Vanderzwalmen et ál. 2000), la superficie sólida de vitrificación (Dinnyes et ál. 2000), puntas gel-loading tips (Tominaga y Hamada 2001), pajillas estiradas cerradas closed-pulled straws (CPS) (Chen et ál. 2001), mallas de nylon (Matsumoto et ál 2001), pipetas flexibles, flexipet denuding pipette (FDP) (Liebermann et ál. 2002), pajillas estiradas abiertas superfina superfinely OPS (SOPS) (Isachenko et ál. 2003), las micropipetas plásticas de diámetro fino (Cremades et ál. 2004), puntas de pipeta de 100  $\mu$ L (Hredzak et ál. 2005), puntas de congelación cryotip y cryotops (Kuwayama et ál. 2005).

En embriones producidos in vitro la técnica ha sido muy eficiente, sin embargo para embriones obtenidos in vivo tanto la congelación como la vitrificación tenía un inconveniente y es que eran eficaces en el estadio de mórula o en blastocistos muy tempranos, lo que obligaba a hacer lavados uterinos pocos días después de la ovulación teniendo unas tasas de recogida muy baja.

Con el desarrollo de la técnica de colapso del embrión se pueden vitrificar blastocistos expandidos con las mismas tasas de éxito similares a los ciclos en fresco.

Además esta técnica permite combinarla con el diagnóstico genético y poder conservar embriones sexados, o seleccionados genéticamente para cualquier característica y que pueda ser comercializado en cualquier posteriormente.

El primero nacido este año pasado en Suiza es gracias al trabajo de una veterinaria española que desarrolla este sistema desde hace 5 años. Y que ha tenido la amabilidad de enviarme estas fotos donde se puede observar en tres imágenes todo el proceso de colapso del embrión.

En cuanto a la posibilidad de vitrificar el semen, la principal desventaja es que la vitrificación sólo sirve para criopreservar pequeños volúmenes de líquido, por lo que en principio sólo es útil en el caso de tener que vitrificar un pequeño número de espermatozoides y a muy baja concentración.

Hablamos de un millón de espermatozoides por mililitro congelado a su vez en pequeñas porciones de microlitros.

Por ello para bancos de semen tradicionales es poco práctico, sin embargo para pacientes oncológicos en humana, especies animales en peligro de extinción, semen sexado o semen que vaya a ser utilizado para ICSI es una opción muy recomendable.

Esta técnica está descrita en muchas especies animales de las cuales hay varios equipos de investigación españoles como en mamíferos silvestres, perros o caballos.

## SELECCIÓN ESPERMATOZOIDEOS DE MAYOR CALIDAD

Los resultados obtenidos en FIV e ICSI se han mejorado con técnicas de selección espermática, habitualmente realizada mediante lavados que imitan el proceso natural de selección, esto es, el paso de los espermatozoides desde la vagina hasta las trompas.

En la actualidad esta selección se complementa mediante la clasificación de células magnéticamente marcadas (MACS). Una de las características menos deseadas en un espermatozoide es una alta fragmentación de su material genético. Numerosos estudios han correlacionado esta fragmentación con un posterior bajo porcentaje de fecundación y de implantación embrionaria. Además esta fragmentación afecta de tal forma al espermatozoide que incluso altera su membrana externa. Lo que se lleva a cabo para separar estos espermatozoides es utilizar un tipo de proteína: la Anexina V, que reconoce estas marcas en la membrana del espermatozoide. Estas proteínas han sido previamente unidas a microesferas magnéticas y posteriormente puestas en contacto con aquella muestra de semen en la que queremos separar los espermatozoides. Es en este momento donde entra en juego el soporte físico del MACS, o columnas de anexina, que serían lo equivalente a una matriz porosa por donde irán avanzando los espermatozoides. Se hace pasar el conjunto de “espermatozoides-Anexina V-microesferas magnéticas” por las columnas, que están situadas dentro de un fuerte campo magnético, consiguiendo capturar todo aquel espermatozoide unido a la Anexina V o, lo que es lo mismo, alterado. Todos aquellos espermatozoides que superan la columna estarán libres de estas alteraciones y por tanto serán óptimos para su posterior uso en la fecundación.

Esta tecnología, ha mostrado que puede separar espermatozoides motiles, viables y morfológicamente normales que despliegan una tolerancia significativa a la criopreservación y tienen un mejor potencial de fertilización.

#### SELECCIÓN EMBRIONARIA- DIAGNOSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

Gracias a la optimización de los diferentes procesos de la FIV y del ICSI y a los avances en diagnósticos genéticos se desarrolló el Diagnóstico Genético Preimplantacional. Esta tecnología representó un gran progreso en la prevención precoz de enfermedades genéticas graves.

Además permite seleccionar embriones con característica genética determinadas como el sexo, o con genes que les hacen resistentes a diferentes enfermedades. Gracias a los avances en el diagnóstico genético de los embriones se puede realizar un cariotipo completo del embrión antes de ser transferido al útero materno y seleccionar aquellos libres de casi cualquier enfermedad hereditaria.

En el año 1990, Alan Handyside publicó la primera aplicación clínica del diagnóstico genético preimplantacional (DGP). En Marzo del 1994, el Instituto Universitario Dexeus en colaboración con la Universitat Autònoma de Barcelona consiguieron el primer nacimiento en España logrado como resultado de un diagnóstico genético preimplantacional para la selección del sexo del embrión.

#### INCUBADORES TIME LAPSE

Un incubador con *time lapse* contiene una cámara capaz de captar imágenes de los embriones en intervalos de tiempo definidos por el laboratorio. Gracias a esta tecnología es posible monitorizar todo el desarrollo embrionario sin sacar los embriones del incubador y, por tanto, sin alterar sus condiciones idóneas de cultivo. Por tanto, se consigue una incubación mucho más estable, sin cambios en la temperatura ni en la humedad del cultivo, lo que se traduce en la obtención de embriones de mayor calidad.

Mediante este sistema se obtiene una gran cantidad de información del desarrollo embrionario, ya que es posible ver todo lo que ocurre. No se obtiene información en único momento en el día sino en muchos puntos a lo largo del día. Esto se traduce en una mejor selección de los embriones que se van a transferir y/o congelar, para así conseguir unas mejores tasas de embarazo.

## TÉCNICAS ÓSMICAS

Y en los últimos años la Genómica, Transcriptómica, Proteómica y Metabolómica intentan comprender cómo un embrión crece y cuáles son sus indicadores de éxito.

Las tecnologías proteómica y metabolómica han desarrollado el análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas y metabolitos, respectivamente, en una célula, un organismo o una muestra. Los metabolitos de bajo peso molecular representan el producto final de procesos de regulación celular, y por lo tanto revela la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas, nutricionales y ambientales

Las últimas investigaciones en las técnicas moleculares están definiendo perfiles génicos, proteicos y metabolómicos para intentar detectar cuál es el ovocito o embrión más hábil, entendiendo esta habilidad como su capacidad para implantar

Actualmente se están desarrollando técnicas cuantitativas para el asesoramiento no invasivo del metabolismo embrionario, y es el objetivo de investigaciones actuales el determinar su valor como predictores de viabilidad embrionaria y embarazo. Las dos técnicas experimentales más utilizadas para el análisis de metabolitos son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS, del inglés mass spectrometry).

## CLONACIÓN.

Clonar significa crear un ser vivo idéntico a otro, a partir de una célula del individuo original.

Todas las células o blastómeros que componen un embrión son totipotentes, capaces de regenerar todo el embrión y todas contienen la misma información genética. Cuando llegan al estadio de blastocisto, es cuando comienza la diferenciación celular. Para poder formar clones de un animal adulto los requisitos mínimos son: núcleo de una célula donante y oocitos previamente enucleados.

Las dos principales técnicas de clonación son:

- Por separación de blastómeros en los embriones (Willadsen 1979).
- Por transferencia nuclear, que fue el método utilizado para clonar a la oveja Dolly. (Campbell et al, 1996, Willmut et al 1997)

En 1997, el Instituto Roslin, en Escocia, clonó por primera vez en la historia, después de 277 intentos, un mamífero a partir de una célula diferenciada de la glándula mamaria de una oveja adulta. Dolly, es el primer mamífero de la historia que se ha clonado de un adulto.

Los animales de alto valor genético para una característica específica como crecimiento, resistencia a las enfermedades o mayor conversión de alimentos pueden ser seleccionados para ser clonados. Otra técnica como la transferencia nuclear se ha utilizado para salvar especies en peligro de extinción; en la isla de Enderby en Nueva

Zelanda, para evitar la pérdida de una raza ancestral y exótica se generaron embriones clonados de la única vaca que quedaba viva.

La utilización de animales clonados con fines experimentales sería ventajosa debido a que eliminaría la variabilidad genética, de tal manera, que solo sería medido el efecto del tratamiento o del ambiente. A pesar de sus ventajas, esta técnica es muy costosa, además de que aún es ineficiente. Aunque no por ello en algunas especies como en caballos se oferta de manera comercial desde has 15 años.

Algunos investigadores consideran que el uso y manipulación del genoma de animales y vegetales puede ser uno de los principales instrumentos para acabar con el hambre del mundo o aportar excelentes fábricas vivas de sustancias químicas muy valiosas para el hombre.

La desventaja es que la clonación no mejora genéticamente a una especie; que todos los individuos sean genéticamente iguales es un riesgo, porque todos son sensibles a las mismas enfermedades. Otra aplicación es la replicación de especies en peligro de extinción, como hizo la empresa ACT con un gaur (*Bos bibos gaurus*) A, un mamífero del sur de Asia (Borneo, Java, Bali, Sumatra). Lo clonaron y el embrión lo implantaron en una vaca; aunque la cría no sobrevivió más de un mes, es una posibilidad.

La aplicación más poderosa es la modificación genética, que puede servir para hacer especies resistentes a enfermedades. Podremos producir proteínas, que actualmente no podemos sintetizar en el laboratorio, si modificamos genéticamente animales para que las produzcan y clonarlos después. Hay animales con el gen que controla la formación de alfa galactosa inactivado, algo que era impensable antes de Dolly. La alfa galactosa rodea las células del cerdo, pero no las humanas. Quitársela es el primer paso hacia un trasplante de un órgano de cerdo al hombre, porque ese azúcar es una de las causas del rechazo de los órganos animales. Y la tercera aplicación, la más controvertida, pero también la más interesante, es el desarrollo de la terapia celular.

## CONCLUSIÓN

En las últimas décadas, las Técnicas de Reproducción Asistida (ARTs), así como las estrategias para mejorar la salud reproductiva, tanto en humanos como en animales de granja, han adquirido un papel cada vez mayor en la sociedad por el alto impacto que tienen sobre el bienestar económico, psicológico y social.

En los seres humanos, la OMS estima que la infertilidad afecta al 20% de las parejas en los países desarrollados, y esta cifra va en aumento cada año. En los países en desarrollo, se estima que la infertilidad afecta a más de una de cada cuatro mujeres en edad reproductiva.

Los continuos avances en la investigación y en la adopción de las tecnologías reproductivas en los animales ofrecen un futuro prometedor permitiendo la obtención y multiplicación de los individuos genéticamente superiores, para la producción de alimentos de calidad para el consumo humano, con resistencia a ciertas enfermedades. Conservar especies y razas en peligro de extinción.

Sin embargo, aún es necesaria mayor investigación para controlar la eficiencia de las técnicas para mejorar el éxito de la Reproducción Asistida, todo un reto para los investigadores del área.