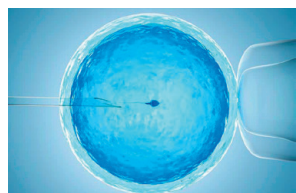
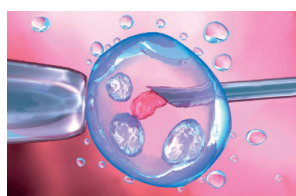
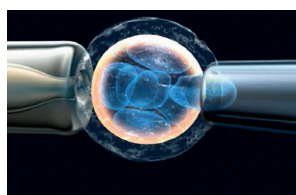
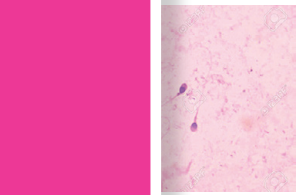
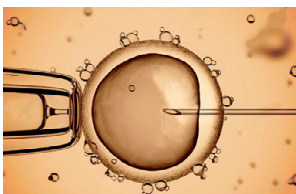
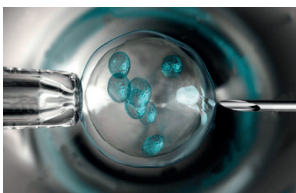
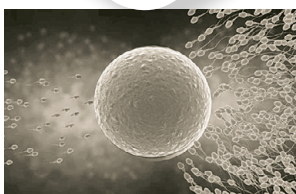
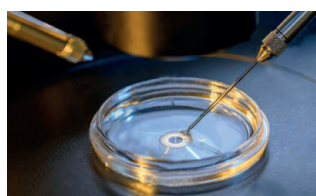
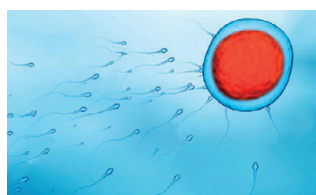


# FERTILIZACIÓN *IN VITRO*: 40 AÑOS DE HISTORIA



# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
• <b>Avances en el laboratorio y técnicas de reproducción asistida</b>	<b>3</b>
— <i>Equipos e instrumentación de laboratorio: desde campanas hasta incubadoras time-lapse</i>	4
— <i>Medios de cultivo y sistemas de cultivo: desde soluciones salinas simples hasta medios de cultivo optimizados complejos</i>	4
— <i>Dotación de personal del laboratorio de FIV: de embriólogos experimentales a clínicos</i>	5
— <i>Los horizontes en expansión de la FIV</i>	5
• <i>Criopreservación</i>	6
• <i>Fertilización asistida</i>	6
• <i>Pruebas genéticas preimplantacionales</i>	7
• <i>Tecnologías de selección de embriones</i>	7
• <b>Avances en genética</b>	<b>8</b>
— <i>Genes reproductivos y trastornos de diferenciación sexual</i>	8
— <i>Secuencia del embrión antes de la transferencia</i>	9
— <i>¿Biopsia de embriones preconcepción o posconcepción?</i>	9
— <i>Evolución del cribado genético preimplantacional</i>	11
<b>2. Estimulación controlada de la ovulación y monitorización</b>	<b>13</b>
— <i>¿La estimulación ovárica controlada produce ovocitos subóptimos?</i>	13
— <i>¿Se puede optimizar la maduración in vitro de los ovocitos?</i>	13
— <i>¿Puede el daño ovárico conducir a la activación del folículo preantral?</i>	14
— <i>¿Los niveles de hormona antimülleriana sérica reflejan la reserva folicular?</i>	14
— <i>¿Es posible diagnosticar la presencia de folículos preantrales in vivo?</i>	16
— <i>¿El aporte suplementario de dehidroepiandrosterona es útil para pacientes con reserva ovárica disminuida?</i>	16

<b>3. El desarrollo y la evolución de las gonadotropinas en la tecnología de reproducción asistida</b>	<b>17</b>
— <i>Gonadotropina coriónica humana: descubrimiento y extracción placentar/urinaria</i>	17
— <i>Uso clínico de los extractos de gonadotropinas provenientes de animales</i>	18
— <i>Gonadotropina humana producida por la hipófisis</i>	19
<b>4. Gonadotropina menopáusica humana</b>	<b>21</b>
— <i>Purificación de FSH a partir de hMG</i>	26
— <i>Gonadotropinas recombinantes</i>	27
— <i>Gonadotropinas de larga duración</i>	31
<b>5. Progreso de la estimulación ovárica para FIV</b>	<b>33</b>
— <i>Perspectiva histórica de la estimulación ovárica</i>	33
— <i>Estimulación ovárica en mujeres con baja respuesta ovárica</i>	34
— <i>Los desafíos actuales de la estimulación ovárica en perspectiva</i>	35
<b>6. Agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas en el contexto de la estimulación ovárica controlada para desencadenar la ovulación</b>	<b>37</b>
<b>7. Selección de pacientes</b>	<b>39</b>
— <i>¿Dónde estamos hoy?</i>	39
— <i>Logros destacados hacia la comprensión del factor endometrial: ¿Cómo llegamos aquí?</i>	40

# 1. Introducción

## Avances en el laboratorio y técnicas de reproducción asistida

El laboratorio de reproducción asistida ha tenido muchos cambios desde que se inició la fertilización *in vitro* (FIV), incluidas las mejoras en el control de la calidad y de los sistemas de cultivo de embriones. Antes de 1985, no había procedimientos “complementarios”, donación de óvulos, extracciones quirúrgicas de esperma, criopreservación o micro-manipulación, y la supervisión gubernamental era nula y exigía pocos requisitos de licencia.

Además, la formación académica en esta área no existía, por lo que las habilidades se adquirieron a través de aprendizajes en la práctica. Los procedimientos en el laboratorio fueron realizados por investigadores expertos en embriología experimental y ciencia veterinaria, quienes establecieron reglas y principios que evolucionaron hasta convertirse en directrices internacionales y procedimientos operativos estándar.

Hoy en día, la reproducción asistida está bien establecida y el camino parece seguir la Ley de Moore, con aumentos lineales en las tasas de implantación apenas por debajo del 1% anual, corregido por la edad materna. Esta progresión lineal ha sido relativamente constante desde los primeros días y puede predecir que, en el futuro cercano, no haya necesidad de múltiples intentos de embarazo.

Antes de que se aceptara la FIV como tratamiento estándar para la infertilidad, se utilizaban laboratorios improvisados, hasta que, en 1980, los pioneros de la FIV –encabezados por el Dr. Robert G. Edwards– construyeron un laboratorio exclusivo para FIV en el Reino Unido. También se abrieron otras clínicas, en el *Royal Women’s Hospital*, en la Universidad de Monash de Australia y en la Escuela de Medicina de Eastern Virginia en Norfolk, Virginia (EE.UU.).

Otros países, como India, Austria, Francia, Holanda, Suecia y España, siguieron rápidamente y establecieron sus propias clínicas. **En 1985, estaba surgiendo una nueva disciplina, un campo que se denominó por primera vez tecnología de reproducción asistida (TRA).**

Al parecer, la FIV se convertirá en una forma obvia de reproducción segura, el medio para evitar mutaciones deletéreas heredables o nuevas, y para permitir que los futuros padres construyan sus familias con previsión.

### ***Equipos e instrumentación de laboratorio: desde campanas hasta incubadoras time-lapse***

La FIV y sus tecnologías asociadas se han basado en los esfuerzos de varios personajes clave. Por ejemplo, en 1850, John Lawrence Smith diseñó el microscopio invertido, y en 1912, Robert Chambers creó el primer micromanipulador para microcirugía celular. Fue en Egipto donde se utilizaron las primeras incubadoras para incubar huevos de gallina, y no fue sino hasta el siglo XIX, que se cambiaron por cántaros calientes. Las incubadoras con camisa caliente se desarrollaron en la década de 1970. Las incubadoras han seguido evolucionando y los embriólogos actualmente no solo cultivan embriones durante períodos más largos, sino que también pueden observar el desarrollo, fotograma a fotograma, gracias a la incorporación de microscopía en los sistemas de incubación.

La instrumentación específica para FIV comenzó a introducirse a fines de la década de 1980, y los laboratorios pioneros se basaron en equipos y materiales que fueron diseñados para el cultivo de tejidos de células somáticas y no para el cultivo de gametos y embriones humanos (o mamíferos). La observación cercana de embriones a través de microscopía ha contribuido a comprender la morfología y el momento de los eventos de desarrollo, y ha permitido, aunque con limitaciones, seleccionar/deseleccionar embriones para su transferencia y criopreservación.

Los *kits* de recolección de óvulos y los catéteres de transferencia embrionaria (TE), así como la bomba que permitía la aspiración suave de líquido folicular (FF) de los folículos ováricos, fueron algunos de los primeros instrumentos/dispositivos específicos de FIV que se desarrollaron.

El primer grupo internacional de médicos y biólogos de FIV compuesto por 26 asistentes, se reunió en Bourn Hall en 1981, y discutió la tecnología emergente de la FIV.

### ***Medios de cultivo y sistemas de cultivo: desde soluciones salinas simples hasta medios de cultivo optimizados complejos***

Hace casi 150 años, Ludwig y Ringer desarrollaron los primeros medios de cultivo de tejidos que consistían en soluciones salinas simples basadas en las propiedades del suero/plasma sanguíneo.

El conocimiento de la bioquímica de los mamíferos permitió que estas soluciones fueran modificadas y que los medios de cultivo fueran más complejos, imitando el entorno del aparato reproductor femenino. Luego, el profesor John Biggers, de la Universidad de Harvard, optimizó el

medio para el crecimiento *in vitro*, mediante la evaluación por separado de cada ingrediente por el proceso de “optimización simplex”. Las variaciones en los medios de segunda generación, denominados medios secuenciales optimizados, y los de tercera generación, todavía se utilizan en la actualidad y parecen igualmente eficaces para apoyar el desarrollo de embriones humanos durante 6 o 7 días de cultivo *in vitro*. Hoy en día, los medios están estrictamente regulados por las agencias gubernamentales, lo que ha contribuido a mejorar los resultados clínicos y de laboratorio.

Los sistemas de cultivo también han evolucionado. En 1963, Ralph Brinster introdujo el cultivo de huevos y embriones en pequeñas gotas de medio de cultivo bajo una capa de aceite de parafina. Con algunas modificaciones, este método de “microgotas” se ha convertido en el sistema más utilizado y exitoso para el cultivo de embriones de mamíferos *in vitro*. Este sistema ha proporcionado un entorno mejor y más estable, así como ventajas significativas para el crecimiento embrionario, que faltaban en los sistemas de cultivo abiertos del pasado. Esto, a su vez, ha llevado a una mayor eficiencia y eficacia del cultivo de embriones.

### **Dotación de personal del laboratorio de FIV: de embriólogos experimentales a clínicos**

La embriología clínica evolucionó en un contexto de 150 años de historia en embriología experimental, criobiología y otros campos relacionados. En el *Bourn Hall Clinic*, durante la década de los ochenta, los embriólogos clínicos eran los encargados de manejar los gametos (incluida la preparación del esperma) y los embriones. También participaban en la optimización de los protocolos de reclutamiento folicular y el momento de la extracción de óvulos.

En la actualidad, los aspirantes a embriólogos pueden capacitarse en tecnologías y técnicas específicas. La dotación de personal adecuada, en sí misma, es un factor importante para mejorar la seguridad y obtener mejores resultados. Hoy, en varios países son los responsables de los certificados y la habilitación de laboratorios para FIV.

Profesionales más capacitados mejoran la seguridad y los resultados de los procedimientos.

### **Los horizontes en expansión de la FIV**

Los avances de la FIV son en todo sentido y van desde la disección parcial de la zona y la inserción subzonal de espermatozoides hasta la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intracytoplasmic*

*sperm injection*); desde la congelación lenta hasta la vitrificación; desde la morfología hasta la morfocinética y la genética.

Entre las tecnologías más importantes que se han ido incorporando se encuentran la criopreservación de ovocitos y embriones, la fertilización asistida para el tratamiento de la infertilidad por factor masculino, el diagnóstico genético de embriones antes de la transferencia y el desarrollo de nuevas metodologías y plataformas de selección de embriones, incluida la morfocinética de embriones utilizando microscopía *time-lapse*.

**Criopreservación.** Los primeros en congelar espermatozoides de mamíferos fueron Chris Polge y col. en 1949. Unos años más tarde, en EE.UU., Raymond Bunge y Jerome Sherman congelaron espermatozoides humanos. En 1971, David Whittingham, Stanley Leibo y Peter Mazur cambiaron el campo de la embriología congelando embriones de ratón en etapa de escisión. A principios de los ochenta, el embrión humano se criopreservó en todas las etapas embrionarias, desde el cigoto hasta el blastocisto eclosionado, con adaptaciones menores, pero las tasas de supervivencia se mantuvieron por debajo del 80% durante muchos años. Durante los últimos 10 años ha habido una mejora espectacular en la criopreservación de ovocitos y embriones con la introducción y la aplicación de la vitrificación. Hoy en día se logran tasas de supervivencia de casi el 100%; los enfoques de tratamiento que implican la criopreservación de todos los embriones y ovocitos se han vuelto más viables, lo que revela las ventajas clínicas de la transferencia retardada en ciclos naturales en lugar de estimulados.

**Fertilización asistida.** En 1886, por primera vez se utilizó la micromanipulación a través de la zona de perforación para ayudar a la fertilización de ratones. En 1988, los bebés nacieron de parejas con infertilidad por factor masculino después de utilizar el micromanipulador como herramienta quirúrgica. Ese mismo año, equipos de Singapur y Roma informaron sobre la inyección de espermatozoides en el espacio perivitelino.

Las tasas de fertilización fueron bajas debido a la ausencia de un bloqueo rápido de la polispermia a nivel de la membrana. Sin embargo, una vez que se logró la fertilización monospermica, las tasas de implantación fueron tan altas, o más altas, que después de la inseminación estándar.

La fertilización asistida mejoró drásticamente con la ICSI por parte de un equipo en Bruselas (Bélgica). A diferencia de las herramientas utilizadas anteriormente, la aguja delgada afilada y recta permitió la

perforación no traumática de la membrana y la colocación de espermatozoides en el citoplasma con precisión. Rápidamente se demostró que las tasas de fertilización eran tan altas como las de la FIV convencional, incluso en los casos más graves de factor masculino.

En la actualidad, la ICSI se está utilizando con una frecuencia cada vez mayor, en algunos casos reemplazando por completo a la inseminación estándar. Aunque tiene éxito en términos de embarazo y tasas de nacidos vivos, la aplicación indiscriminada de ICSI cuando no está indicada sigue siendo debatida.

**Pruebas genéticas preimplantacionales.** Richard Gardner, demostró en 1968 que la biopsia de trofoectodermo y el sexado del embrión de conejo eran compatibles con la obtención de descendencia viva. Alan Handyside y el equipo del Hospital Hammersmith de Londres, informaron por primera vez en 1989 el diagnóstico genético exitoso de defectos de un solo gen mediante biopsia de blastómeros o pruebas genéticas de preimplantación (PGT). El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Gary Mullis en la década de los ochenta fue muy importante para el éxito de la secuenciación rápida de células individuales, un requisito previo para las PGT.

El descubrimiento de la alta incidencia de anomalías cromosómicas en células embrionarias biopsiadas llevó a evaluar los embriones y a realizar transferencia selectiva solo de embriones euploides, una variación de la PGT conocida como PGT para aneuploidía (PGT-A). La eficacia de la PGT-A ha sido objeto de debate durante más de 20 años. La biopsia de embriones ha demostrado que la manipulación de embriones a nivel celular no siempre está libre de daños, y es muy necesaria la optimización de las técnicas. ¿Quizás esto se pueda lograr utilizando un enfoque no invasivo sin biopsia? También existen preocupaciones sobre la alta frecuencia del mosaicismo, pero la PGT ha sido de gran beneficio para las parejas en riesgo de transmitir enfermedades genéticas.

**Tecnologías de selección de embriones.** Uno de los desafíos pendientes en el laboratorio de TRA es el desarrollo de métodos de selección de embriones eficaces (y asequibles), para facilitar la TE única de rutina en todos los grupos de pacientes. En el ratón, las pequeñas aberraciones de la morfología reducían significativamente la implantación, pero en el ser humano, la morfología del embrión y la tasa de desarrollo solo se correlacionaron de manera deficiente con el resultado. La búsqueda de características que puedan predecir la implantación ha puesto a los investigadores a analizar varios de los aspectos del desarrollo de gametos y embriones en cultivo, y ha llevado a la elaboración de



algoritmos complicados. Hasta ahora, no se ha identificado un solo marcador morfológico común que pueda predecir con certeza el éxito futuro de un embrión. La selección de embriones confiables utilizando un solo parámetro o algoritmo aplicable a todos los pacientes sigue siendo difícil de alcanzar.

## Avances en genética

En la década de los cincuenta, los genes desempeñaban un papel fundamental en relativamente pocos trastornos médicos. Se conocían algunos errores innatos del metabolismo, al igual que varios trastornos monogénicos como la hemofilia A o la anemia de células falciformes. A finales de los sesenta empezó el diagnóstico genético prenatal después de que se demostró que era posible cultivar células de líquido amniótico (1966). Sin embargo, incluso en la década de 1970, la aplicación clínica no se utilizó ampliamente.

En 2018, celebramos el éxito paralelo tanto de la FIV como de la genética reproductiva. Esto es posible gracias a líderes en ambos campos que dieron un paso adelante no solo para hacer avanzar la ciencia, sino también para construir la infraestructura necesaria para la colaboración y la supervisión ética.

## *Genes reproductivos y trastornos de diferenciación sexual*

No fue hasta 1956, gracias a Tjio y Levan, que se conoció que los seres humanos tenían 46 cromosomas, gracias a que generaron un cariotipo a partir de linfocitos. Poco después se reconocieron trisomías autosómicas (de 13, 18 y 21) y anomalías cromosómicas sexuales. Los ginecólogos se enteraron de que el síndrome de Turner se debía a la monosomía X. Se asumió que la insuficiencia ovárica equivalía a la presencia de células de monosomía X (en algún lugar), incluso si los linfocitos no eran mosaicos 46,XX.

Los genes mutantes no se consideraron causas importantes de enfermedad ovárica hasta mucho más tarde. Ahora se reconoce que las causas monogénicas son mucho más comunes en adultos con insuficiencia ovárica prematura que el mosaicismo 45,X/46,XX. El concepto de heterogeneidad genética hoy en día está bien aceptado.

En la insuficiencia ovárica prematura (IOP) Aittomäki y de la Chapelle aplicaron la nueva secuenciación molecular para confirmar la etiología autosómica recesiva de la disgenesia gonadal XX. Tanto la genética reproductiva como el TRA se beneficiaron de la aplicación temprana de la tecnología citogenética.

Actualmente, las PTG-A se aplican ampliamente para aumentar la probabilidad de que una transferencia de embriones tenga éxito. Hace años, la tecnología no podía basarse en el cariotipo de una sola célula, pero después se hizo posible gracias a la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con sondas específicas de cromosomas. Inicialmente, solo se podían evaluar de cinco a nueve cromosomas, pero en 2010 las nuevas tecnologías genómicas –como la secuenciación de próxima generación (NGS, *next generation sequencing*)– permitieron evaluar los 24 cromosomas. Dado esto, se ha demostrado que la biopsia de trofoectodermo y la PGT-A benefician a las mujeres de 35 a 40 años. Con el uso de PGT-A, las tasas de embarazo aumentan en un 20% y las tasas de aborto espontáneo disminuyen, y son iguales en mujeres de 35 a 40 años que en mujeres más jóvenes.

### **Secuencia del embrión antes de la transferencia**

En los últimos 40 años, la secuenciación de ADN ha presentado una velocidad de avance mayor que la FIV. Inicialmente, una secuencia de nucleótidos solo podía deducirse de forma retrospectiva sobre la base de la secuencia de aminoácidos. El desarrollo de la tecnología de PCR permitió amplificar el ADN en cantidad suficiente para realizar la secuenciación. Ahora se pueden diferenciar las secuencias de ADN normales de las mutantes sobre la base de la longitud de los fragmentos de ADN fetal y, de esta forma, distinguir las secuencias normales de las afectadas. El genoma humano secuenciado se logró en 2000 y nuevamente, de manera más completa, en 2006.

Ante la pregunta, ¿cuál será el resultado final de las pruebas genéticas para la TRA? La respuesta es que las pruebas genéticas, como la secuenciación del exoma completo (WES, *whole exome sequencing*), se volverán tan rutinarias como la PGT-A.

La secuenciación PGT-A plus ya aumenta significativamente el número de embriones que no deben transferirse. La transferencia por TRA después de pruebas específicas o WES dará como resultado un 80% de éxito.

### **¿Biopsia de embriones preconcepción o posconcepción?**

Verlinsky y Pergament, que colaboraron en el establecimiento de la biopsia de vellosidades del corion para el diagnóstico prenatal, fueron los primeros en proponer el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) mediante biopsia embrionaria en 1984. Verlinsky y colaboradores se convertirían más tarde en los pioneros de la biopsia de cuerpo

**Reacción en cadena de la polimerasa**

**GENÉTICA Y GENÓMICA DE CÉLULA ÚNICA**

**DGP propuesto (Penketh y McLaren)**

Primer intento de análisis de cuerpo polar  
 Primer informe de un gen *knock out* en el ratón  
 Primer DGP en modelo de ratón con síndrome de Lesh-Nyhan  
 Informe de efectos de biopsia de escisión humana

**PCR anidada**

WGA de célula única por PCR

**FISH multicolor para sexo en enfermedades asociadas con el sexo**

**FISH multicolor para aneuploidía**

Biopsia de blastocisto asistida por láser  
 FISH multicolor para translocaciones recíprocas

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL**

**Primeros nacimientos con DGP en el mundo en enfermedades asociadas con el sexo**

**Primer nacimiento con fibrosis quística (SGD) con DGP**

Primer DGP con SGD con predisposición al cáncer  
 Primer DGP para translocaciones cromosómicas

**Primer nacimiento luego de DGP y coincidencia HLA**

**Primer embarazo con cariomapeo en EE.UU. y Reino Unido**

**CRIBADO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL**

**Primeros nacimientos PGS (FISH)**

Primeros PGS (FISH) usando cuerpos polares  
 Primeros nacimientos por CGH  
**Primer ensayo CHG**

Primer ensayo RTC PGS CGH

ESTEEM PGS RTC (cuerpos polares)

**PCRC en tiempo real PGS**

**Primer nacimiento NGS PGS**

STAR PGS RTC (blastocisto)

**Primer nacimiento con CGH (cuerpo polar)**

**DIAGNÓSTICO GENÓMICO DE ÚNICA CÉLULA**

Ensayo de 24 PGS

Ensayo de cariomapeo de SNP  
 VeriSeq NGS basada en PGS

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

**\$1000 genoma**

**Secuenciación del genoma humano**

**Célula única con WGA por MDA**

Ensayos genotípicos SNP  
 Vitricación de ovocitos y blastocitos humanos

**PCR por fluorescencia múltiple**

Primeros genomas individualizados por NGS  
 WGA por método basado en biblioteca de PCR

**Ensayo CGH 24 cromosomas**

**SNP genotípico y cariomapeo NGS 24 cromosomas**

**Figura 1.** Una breve cronología de las pruebas genéticas previas a la implantación. Algunos de los principales avances en 1) genética y genómica unicelulares, 2) diagnóstico genético preimplantacional (ahora pruebas genéticas preimplantacionales para enfermedades monogénicas [PGT-M]), 3) cribado genético preimplantacional (ahora pruebas genéticas preimplantacionales para aneuploidia [PGT-A 1]), y 4) diagnósticos de célula única disponibles comercialmente (paneles de arriba a abajo) se enumeran desde mediados de la década de 1980 en adelante. Hubo tres hitos importantes en la genética molecular humana durante este período: el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos cortos de ADN a mediados de la década de 1980; la secuenciación de un primer borrador del genoma humano a principios de la década de 2000, y la primera secuenciación del genoma completo en 2014.

DGP, diagnóstico genético preimplantacional; WGA, amplificación del genoma total; CGH, hibridización comparativa de genoma; MDA, amplificación de desplazamiento múltiple; SNP, polimorfismo de nucleótido único; NGS, secuenciación de próxima generación; PGS, cribado genético preimplantacional; PCRc, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

polar, eliminando, en un principio, solo el primer cuerpo polar para pruebas genéticas, para diagnosticar si el correspondiente ovocito fecundado había heredado la copia del gen materno normal o mutado (alelo). Una ventaja de este enfoque previo a la concepción era que evitaba la manipulación de embriones fertilizados, que algunos consideraban poco ético, y evitaba posibles daños al embrión. Sin embargo, las limitaciones, como la recombinación en la primera división meiótica, que evita el diagnóstico en un número importante de ovocitos, fueron rápidamente identificadas. Posteriormente, los mismos investigadores desarrollaron una estrategia de biopsia del primer y segundo cuerpo polar y el seguimiento con una biopsia de blastómero en etapa de escisión para evitar las limitaciones e incluir la detección del alelo paterno.

A finales de la década de 1980, los medios de cultivo de FIV se basaban en los optimizados para líneas celulares de mamíferos y se complementaban con suero materno inactivado por calor. Esto apoyó el desarrollo a la etapa de blastocisto. La biopsia en etapa de escisión se convirtió en el método predominante para el DGP y siguió siéndolo hasta que las clínicas comenzaron a cambiar cada vez más a la biopsia de blastocisto durante los últimos 5 a 10 años.

Actualmente, el cultivo de blastocistos es de rutina y las tasas de embarazo por transferencia son más altas que con los embriones en etapa de escisión. El método original para biopsiar las células del trofoectodermo era mediante extirpación frotando una aguja contra la pipeta de sujeción, lo que dañaba las células en el proceso. El desarrollo de láseres infrarrojos sin contacto, tanto para la perforación de zonas como para la biopsia, fue un gran avance.

## ***Evolución del cribado genético preimplantacional***

El cribado genético preimplantacional (PGS, *preimplantation genetic screening*) se aplicó clínicamente por primera vez hace 25 años, y se basó en la observación de que muchos embriones humanos, a diferencia de la mayoría de otras especies, son cromosómicamente

anormales. Los embriones con anomalías cromosómicas numéricas en todas sus células (aneuploides, haploides o poliploides) rara vez se implantan y, si lo hacen, se producen abortos. Por lo tanto, los científicos plantearon la hipótesis de que la selección de embriones euploides para la transferencia podría mejorar las tasas de implantación y reducir las tasas de aborto espontáneo, lo que mejora las tasas de embarazo por transferencia.

La principal causa de disminución del potencial embrionario con el avance de la edad materna son las anomalías cromosómicas, y si se producen y reemplazan a embriones euploides, el efecto de la edad materna sobre la implantación desaparece en su mayor parte.

¿Cómo se desarrolló el PGS? La confluencia de técnicas de micromanipulación creadas principalmente en el laboratorio de Cohen (es decir, el uso de ácido Tyrode para realizar la eclosión asistida y así obtener una mejor biopsia del día 3), las sondas marcadas con fluorescencia de Ulli Weier y el apoyo de Luca Gianaroli mediante la contribución de material, dio como resultado lo que ahora se conoce como PGS, es decir, biopsia en etapa de escisión y pruebas FISH de embriones.

El criterio estándar actual para PGS es biopsia de blastocisto, vitrificación, análisis de la biopsia con el uso de NGS y transferencia en un ciclo de descongelación. Esto permite un tiempo suficiente para el análisis, un mejor entorno endometrial para la implantación y la centralización de los servicios de laboratorio con una capacidad de secuenciación cada vez mayor, lo que genera precios más bajos.

En los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en nucleasas específicas de secuencia ha mejorado la viabilidad de la construcción de vectores de donantes, la edición del genoma con el uso de oligonucleótidos, la edición del genoma multiplexado, la eficiencia en la selección de *loci* genómicos específicos, la edición directa del genoma de la electroporación de embriones y, por sobre todo, ha permitido evitar el mosaicismo en embriones humanos. Este avance tecnológico hace que la posibilidad de editar la línea germinal humana sea mucho más factible que en el pasado.

## 2. Estimulación controlada de la ovulación y monitorización

El procedimiento original de FIV desarrollado por Steptoe y Edwards se basó en la obtención de ovocitos maduros durante ciclos naturales para pacientes con defectos de las trompas de Falopio. La aplicación exitosa de FIV fue seguida por el uso de gonadotropinas para estimular múltiples folículos preovulatorios y, de esta forma, tratar a pacientes infértiles sin defectos tubáricos. A esto siguió el desarrollo de diversas TRA. Actualmente, la vitrificación y la donación de ovocitos se han convertido en técnicas aceptadas, y la congelación de tejido ovárico sigue ganando aceptación.

### ***¿La estimulación ovárica controlada produce ovocitos subóptimos?***

La respuesta es no. Aunque el reclutamiento de un gran número de folículos preovulatorios después de la estimulación ovárica controlada (EOC) podría llevar a la recuperación de ovocitos deficientes, hay varios estudios que demuestran que, en pacientes jóvenes, las tasas de embarazo por ciclo después de la EOC son más altas que en los ciclos naturales, y las tasas acumuladas de nacidos vivos son comparables entre la EOC y los ciclos naturales.

En pacientes mayores, los folículos que contienen ovocitos de alta calidad podrían secretar más factores paracrinos, como el factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF9) y las proteínas morfogenéticas óseas 15 y 6 (BMP15, BMP6), y promover la foliculogénesis para el reclutamiento durante los ciclos naturales, mientras que la EOC podría conducir a la recuperación de ovocitos subóptimos. La EOC ha dado lugar a tasas de implantación más bajas, en comparación con el ciclo natural en pacientes mayores (35 a 42 años).

### ***¿Se puede optimizar la maduración in vitro de los ovocitos?***

Sí. La maduración *in vitro* (MIV), una técnica para evitar la hiperestimulación ovárica, implica la aspiración de ovocitos en etapa de vesícula germinal de los folículos antrales tempranos en ciclos no activados o

mínimamente estimulados, especialmente de pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos. Estos ovocitos, junto con células del *cummulus*, reanudan espontáneamente la meiosis hasta la metafase II antes de la fertilización.

Los estudios en animales han indicado que las células de la granulosa en los folículos antrales y preantrales secretan factor natriurético de tipo C (CNP) para suprimir la degradación de las vesículas germinales de los ovocitos. Los niveles de CNP disminuyen después de que las células de la granulosa se exponen al pico de hormona luteinizante (LH) a mitad del ciclo, lo que lleva a la reanudación de la meiosis y la maduración nuclear. Por tanto, el aislamiento de los complejos ovocito-*cummulus* o de ovocitos erosionados de los folículos antrales durante la MIV, permite la degradación espontánea de las vesículas germinales. La maduración citoplasmática de los ovocitos esenciales para el desarrollo embrionario temprano es inadecuada para los ovocitos utilizados en la MIV.

Los estudios en animales han indicado que el aumento de LH estimula múltiples factores paracrinicos derivados de las células de la granulosa (p. ej., factor neurotrófico derivado del cerebro [BDNF], factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 [IGF-1], factor de crecimiento de fibroblastos 10 [FGF10], factor neurotrófico derivado de células gliales) para que actúen sobre los ovocitos o las células del *cummulus* para promover el desarrollo embrionario temprano. La inclusión de estos factores durante el cultivo podría promover el éxito de la MIV.

### ***¿Puede el daño ovárico conducir a la activación del folículo preantral?***

Sí; los estudios clásicos que utilizan la resección en cuña y la perforación con láser laparoscópico han demostrado la eficacia de los procedimientos de daño ovárico para promover el crecimiento temprano del folículo antral en los ovarios poliquísticos.

### ***¿Los niveles de hormona antimülleriana sérica reflejan la reserva folicular?***

Solo de forma parcial. La hormona antimülleriana (AMH) es una hormona paracrina cuya secreción aumenta en los folículos primarios y secundarios; logra niveles elevados en la etapa antral temprana, los cuales disminuyen en los folículos preovulatorios. Los folículos de 5-8 mm de diámetro aportan aproximadamente al 60% de la AMH circulante; las células de la granulosa de los folículos preovulatorios > 10 mm de diámetro no producen AMH en mujeres normales.

Debido a que la AMH no es una hormona endocrina, sus niveles séricos reflejan principalmente la “fuga” del ovario, y no muestran necesariamente el número de folículos ováricos. Aunque la detección de AMH sérica indica la presencia de folículos antrales secundarios o tempranos, no se puede descartar la presencia de folículos primordiales no secretores de AMH (Figura 2). De hecho, los pacientes con niveles indetectables de AMH responden al procedimiento de activación *in vitro* (IVA) debido a la presencia de folículos primordiales residuales. Por tanto, la detección de AMH en suero asegura la presencia de folículos secundarios, pero los niveles de esta hormona no reflejan con precisión la reserva ovárica.

AMH sérica	Medio	Alto	Medio o bajo	Bajo	No detectable
Folículo preovulatorio					
Folículos antrales					
Folículos antrales tempranos					
Folículos secundarios					
Folículos primarios					
Folículos primordiales					
	Ciclo	SOP	Mujeres infértiles de mediana edad	Insuficiencia ovárica primaria	

**Figura 2.** Los niveles séricos de hormona antimülleriana varían con los diferentes estados fisiológicos y patológicos.

SOP, síndrome de ovarios poliquísticos.



### ***¿Es posible diagnosticar la presencia de folículos preantrales in vivo?***

Sí; al conjugar un fluoróforo II infrarrojo a hormona foliculoestimulante (FSH) se pueden obtener imágenes de los receptores de FSH en las células de la granulosa de los folículos preantrales en ratones vivos. Debido a que los receptores de FSH se expresan en folículos primarios y más grandes y el fluoróforo tiene baja toxicidad celular y rápida eliminación, los estudios clínicos futuros podrían revelar si este enfoque es útil para detectar folículos preantrales en pacientes con baja reserva ovárica.

### ***¿El aporte suplementario de dehidroepiandrosterona es útil para pacientes con reserva ovárica disminuida?***

Hay información de que la suplementación con dehidroepiandrosterona (DHEA) mejora la función ovárica, aumenta las posibilidades de embarazo, reduce la aneuploidía y disminuye las tasas de aborto espontáneo en pacientes con reserva ovárica disminuida (ROD). Sin embargo, un metanálisis que incluyó 200 ciclos de FIV indicó que no hay pruebas suficientes de la eficacia del aporte suplementario de DHEA en mujeres con ROD o con respuesta deficiente.

Además, no se encontró ninguna mejora en los marcadores de respuesta ovárica, en la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotropina o en los resultados de la FIV en pacientes con respuesta deficiente que recibieron tratamiento previo con DHEA.

### 3. El desarrollo y la evolución de las gonadotropinas en la tecnología de reproducción asistida

La conexión entre las gónadas y la glándula hipófisis fue establecida a principios del siglo XX, mediante experimentos con animales, en los cuales se observó que, al extirpar la hipófisis, las gónadas se atrofiaban, y esto se revertía con un implante pituitario. La asociación gónadas-hipófisis fue confirmada cuando se realizó un implante de glándulas hipófisis anteriores en animales inmaduros, lo cual provocó una maduración sexual precoz.

En 1929, Zondek propuso la existencia de dos productos diferentes secretados por la glándula hipófisis capaces de estimular las gónadas, los cuales nombró prolan A y prolan B. Se propuso que el crecimiento folicular era estimulado por prolan A, mientras que la secreción de "foliculina" era estimulada por ambas sustancias. Pro-lan B inducía la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la secreción de luteína y foliculina. Estas dos hormonas fueron clasificadas como gonadotropinas, haciendo alusión a su efecto en las gónadas. Más adelante, prolan A pasó a llamarse hormona foliculoestimulante (FSH), y prolan B, hormona luteinizante (LH).

Prolan A y prolan B fueron clasificadas como gonadotropinas, debido a que actúan sobre las gónadas. Prolan A se conoce como FSH y prolan B, como LH.

#### ***Gonadotropina coriónica humana: descubrimiento y extracción placentar/urinaria***

En 1927, Ascheim y Zondek demostraron que la sangre y la orina de embarazadas contenían una sustancia estimulante de la gónada, la cual se pensaba que era producida en la hipófisis. Este descubrimiento permitió el desarrollo de la prueba de embarazo Ascheim-Zondek, que consistía en inyectar a una ratona sexualmente inmadura una muestra de orina humana. Si la mujer estaba embarazada, los ovarios del animal se agrandaban (2 a 3 veces más de su tamaño) y presentaban manchas rojas (debido a hemorragias en los folículos), u ocurría la luteinización y el cuerpo lúteo se hacía visible, a pesar de que la ratona no había llegado a la maduración sexual.

Por otro lado, Seegar Jones y colegas realizaron estudios en cultivos *in vitro* de vellosidades coriónicas, y concluyeron que la secreción de esta hormona provenía de la placenta, y no de la hipófisis. Consecuentemente, **este producto fue llamado gonadotropina coriónica humana (hCG, por su sigla en inglés).**

En 1931, la farmacéutica Organon produjo un extracto de hCG, apto para usar en seres humanos (inicialmente llamado Pregnon®, y luego Pregnyl® en 1932). Sin embargo, la reproducibilidad de este producto fue limitada, en parte debido al uso de unidades de animales para medir su bioactividad. Una unidad de "rata" fue definida como la cantidad de preparación de hCG necesaria para producir la apertura vaginal y el establecimiento del estro, al ser inyectada en ratas sexualmente inmaduras.

El estándar internacional de hCG (el primero para una gonadotropina) fue introducido en 1939 por la Liga de las Naciones, en el cual 1 UI de hCG fue definida como la actividad contenida en 0.1 mg de hCG preparada. Un año más tarde, se habilitaron los preparados de hCG purificada de orina, con una bioactividad de hasta 8500 UI/ml, extraída de orina recolectada de la primera mitad del embarazo. Durante el tratamiento para la infertilidad, la hCG es utilizada para inducir la maduración folicular final y la ovulación, así como para mantener la fase lútea. Además, la hCG puede emplearse para tratar el hipogonadismo en hombres, ya que estimula a las células de Leydig para producir testosterona.

La hCG es utilizada para inducir la maduración folicular final y la ovulación, y para mantener la fase lútea.

### **Uso clínico de los extractos de gonadotropinas provenientes de animales**

Los estudios que demostraban la acción fisiológica de las gonadotropinas, sugerían que estos extractos podían ser útiles en el tratamiento de pacientes infértiles con insuficiencia gonadotrópica. El primer extracto, el cual estuvo disponible en 1930, provenía de la hipófisis de cerdos. Luego, se produjeron preparados a partir de hipófisis de oveja, y de suero de gonadotropinas de yeguas preñadas (PMSG, por su sigla en inglés). Los extractos estimulaban el aumento de secreción de estrógeno en mujeres, lo que resultaba en un incremento del tamaño de ovarios quísticos. Fue así que, en 1941, se introdujo un "protocolo de dos pasos" desarrollado por Mazer y Ravetz, el cual consistía en estimular los ovarios utilizando gonadotropinas animales (PMSG o gonadotropinas hipofisarias de oveja o de cerdo) para inducir el cre-

cimiento y el desarrollo folicular, y luego inducir la ovulación usando la hCG.

Sin embargo, se observó que la estimulación ovárica solo se mantenía por un período corto, y disminuía gradualmente hasta desaparecer. En 1942, Ostergaard, Zondek y Sulman postularon que esta respuesta gradualmente disminuida se debía a la producción de "anti-hormonas" (anticuerpos) a las gonadotropinas animales. En 1948, Leatham y Rakoff afirmaron que la producción de estas anti-hormonas implicaba que las gonadotropinas animales eran de uso clínico limitado. El desarrollo de anti-hormonas fue confirmado por Maddock en 1956, quien las identificó entre los días 44 y 76 luego de un tratamiento prolongado con preparaciones de FSH animal.

### ***Gonadotropina humana producida por la hipófisis***

Debido a que las gonadotropinas animales pasaron a ser de uso clínico limitado, Gemzell originalmente extrajo gonadotropinas de hipófisis cadavéricas humanas en 1958; en ese mismo año, se publicaron reportes que indicaban una exitosa estimulación folicular luego de la administración de hCG para inducir la ovulación. En 1963, Bettendorf demostró que la estimulación ovárica con gonadotropina hipofisaria humana (HPG, *hypothalamic-pituitary-gonadal*) era posible en individuos hipofisectomizados, y entre 1958 y 1988, se utilizaron preparados de HPG de forma exitosa para inducir la ovulación. Sin embargo, la producción de HPG requería hipófisis humanas a partir de cadáveres, y su disponibilidad limitada no podía cubrir la creciente demanda de preparados de gonadotropinas. Además, más de 20 años después de su introducción, se asociaron casos fatales de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica con el uso de HPG y la hormona hipofisaria de crecimiento en el Reino Unido, Francia y Australia. Todos los individuos afectados habían recibido estos productos de agencias del gobierno; como consecuencia, la HPG fue removida del mercado.

En 1963, la estimulación ovárica con HPG era posible en individuos hipofisectomizados.



## 4. Gonadotropina menopáusica humana

En 1954, Borth y col. descubrieron que la orina posmenopáusica contenía altos niveles de FSH y LH, las cuales podían ser extraídas; sin embargo, los extractos tenían que ser liofilizados antes de su almacenamiento para evitar su oxidación. La inyección de este producto a ratas infantiles hipofisectomizadas resultó en un incremento lineal del peso del útero y de los ovarios. La misma inyección en ratas macho infantiles hipofisectomizadas indujo la estimulación de las células de Leydig para producir testosterona, lo que causó un incremento lineal del peso de la próstata ventral. Subsecuentemente, el uso terapéutico de gonadotropina menopáusica humana (hMG, *human menopausal gonadotropin*) en seres humanos fue sugerido en 1957.

La primera preparación de hMG fue aprobada para uso clínico en 1950.

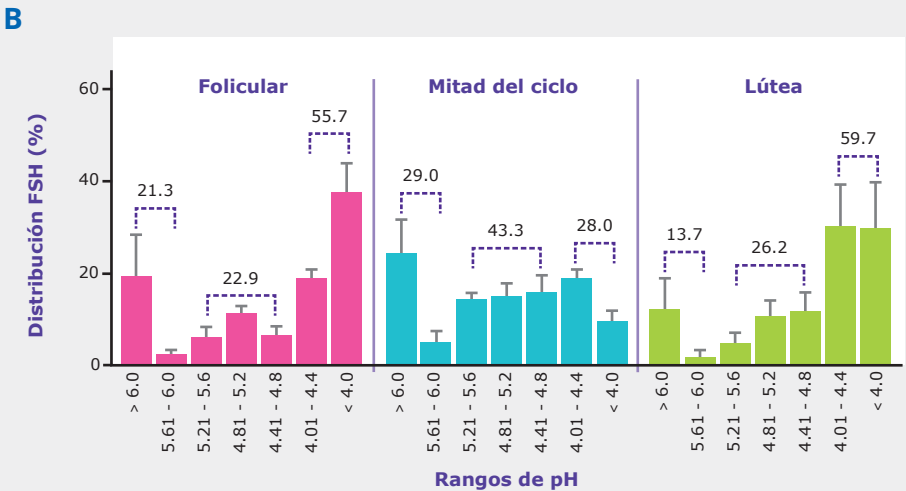
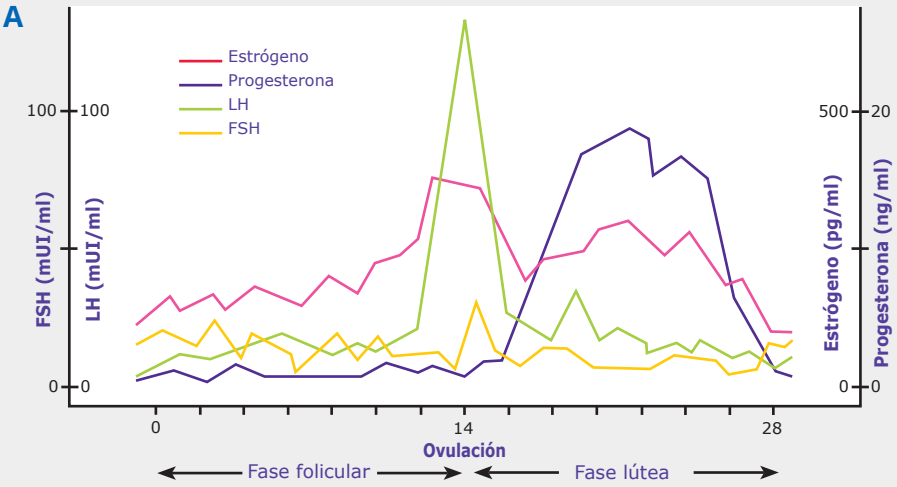
La primera preparación de hMG (Pergonal® 25) fue registrada para uso clínico por Serono en Italia en 1950, pero no se reportaron resultados clínicos en la literatura médica. Las siguientes preparaciones fueron mejoradas debido a que la tecnología de purificación aumentó, y las proporciones de LH y FSH se estandarizaron (Pergonal® 75 contenía 75 UI de FSH y 75 UI de LH). Sin embargo, estos productos aún contenían remanentes urinarios no deseados. Además, se necesitaba un gran volumen de material inicial para su producción (eran necesarios aproximadamente 3.5 l de orina para producir una ampolla de Pergonal® 75).

Cuando las primeras preparaciones de hMG fueron registradas, se utilizaban las unidades “animales” (ratón o rata) para definir su bioactividad. Una unidad de “rata” era la cantidad de preparación necesaria para inducir el estro en ratas prepúberes de 28 días, y esta unidad variaba de acuerdo con la cepa de rata usada. Sin embargo, al igual que con hCG, la ausencia de una unidad internacional establecida significaba que no se podían iniciar ensayos clínicos.

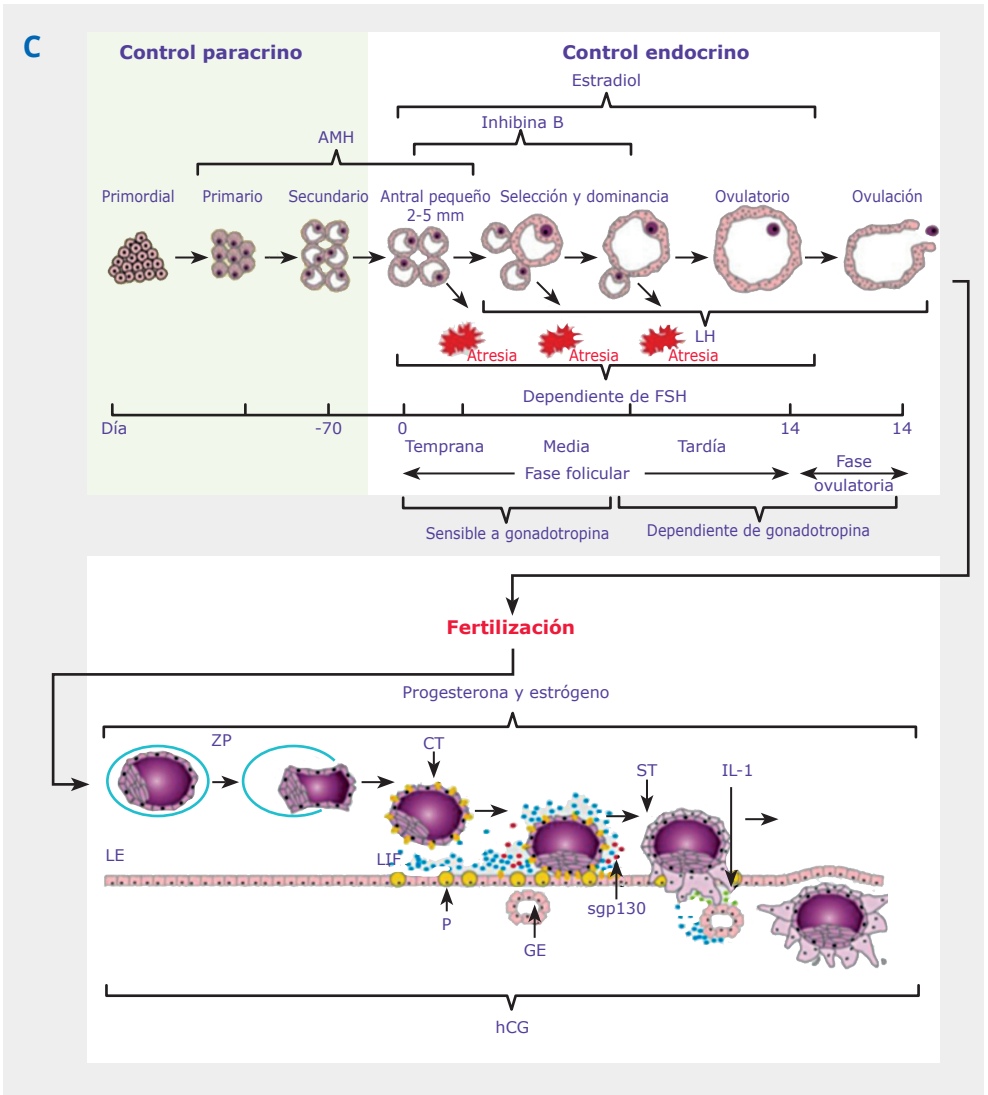
En los años cincuenta, lotes de extracto de caolín de orina menopáusica (hMG 20, hMG 20<sup>a</sup> y hMG 24) fueron producidos por *Organon Newhouse* para ser usados como productos de referencia y, así, estandarizar los métodos de preparación. **La disponibilidad de los productos de referencia también permitió estudiar las variaciones diarias de gona-**

**dotropinas y de secreción de esteroides durante un ciclo menstrual normal, con la finalidad de buscar imitar ese patrón fisiológico en futuros ensayos clínicos.**

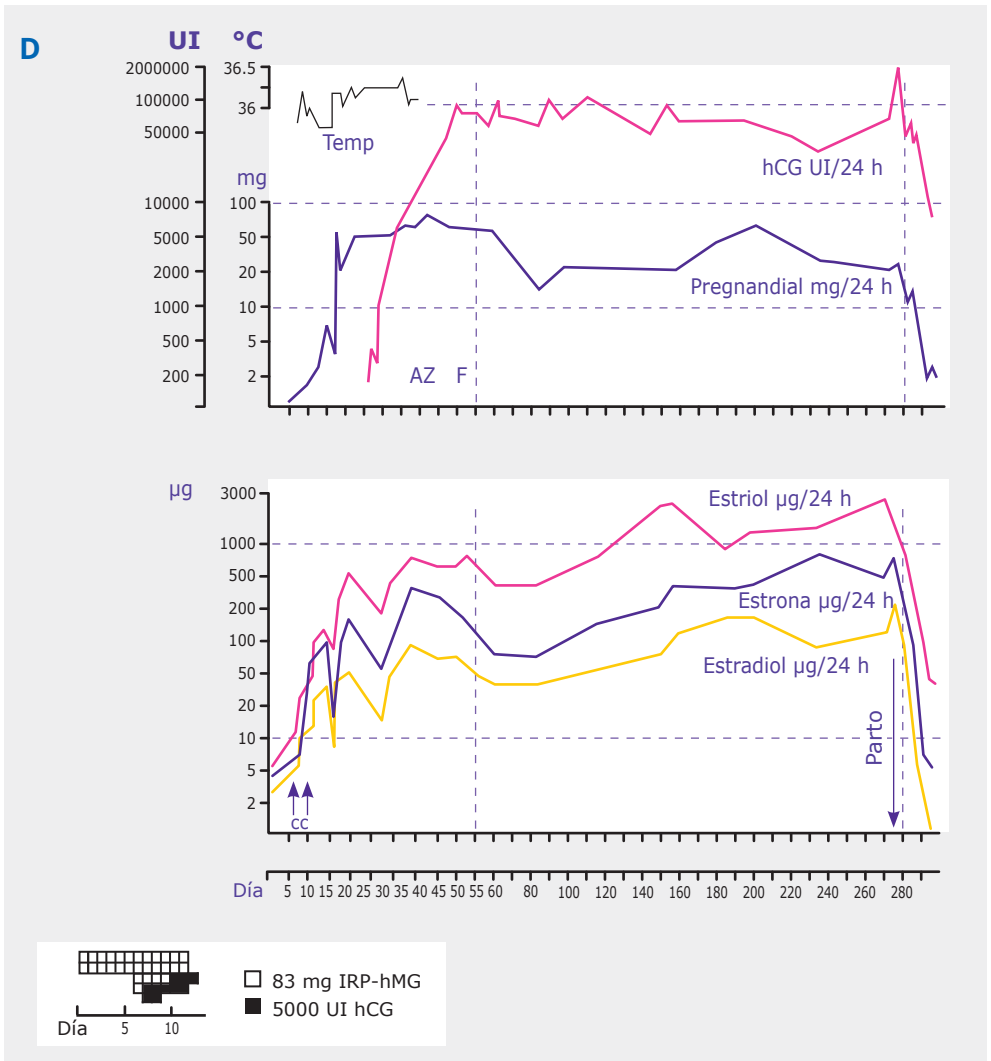
En 1959, la mayoría de estos productos de referencia se habían agotado, y no era posible producir más lotes de la misma fuente. Debido a esto, Pietro Donini, de Serono, donó 50 g de Pergonal® 23 para ser usado como producto de referencia. Cada ampolla de esta prepa-



ración contenía 5 mg de hMG, lo cual equivalía a 40 UI de FSH y 40 UI de LH. Este material se convirtió en la referencia internacional de preparación (IRP, por su sigla en inglés), y en 1964 se convirtió en el estándar internacional para FSH y LH, para la cuantificación de hMG. Esto permitió determinar el contenido relativo de gonadotropina en una preparación, lo que posibilitó una dosificación más reproducible y precisa (Figura 3).







**Figura 3.** (A) Niveles de hormonas hipofisarias y ováricas durante el ciclo menstrual; (B) secreción de FSH durante el ciclo menstrual; (C), ovulación y fertilización del ovocito hasta su implantación, y (D) patrón hormonal durante la fase folicular, la ovulación, la fase lútea y el embarazo luego de la estimulación con hMG en una paciente con amenorrea primaria y con hipopituitarismo e hipogonadotropismo, que presentó un embarazo con hMG utilizada para la estimulación de la ovulación. (\*La dosis inicial fue de 240 mg de IRP-hMG [correspondiente a 150 UI], con un incremento a 360 mg [225 UI], luego a 480 mg [300 UI], antes de la disminución gradual a 360 mg y 240 mg de IRP-hMG. La ovulación fue inducida con 10 000 UI de hCG, seguido de 10 000 y 5000 UI de hCG en días consecutivos).

AMH, hormona antimülleriana; BL, blastocito; CT, citotrofoblasto; FSH, hormona foliculoestimulante; GE, epitelio glandular; h, horas; hCG, gonadotropina coriónica humana; IL-1, interleuquina-1; IU, unidades internacionales; LH, hormona luteinizante; LIF, factor inhibidor de leucocitos; P, pinópodo; sgp130, gp soluble 130; ST, sincitiotrofoblasto; Temp, temperatura; ZP, zona pelúcida.

Los ensayos clínicos utilizando hMG iniciaron cuando estas preparaciones fueron aceptadas por la comunidad científica y las agencias regulatorias, a pesar de su alta impureza, ya que no habían otras alternativas disponibles. En 1960, se demostró que el uso de hMG en mujeres con anovulación, hipopituitarismo, hipogonadotropismo y amenorrea primaria, inducía los cambios esperados en el endometrio y el epitelio vaginal, así como la inducción de la secreción de esteroides. Luego, en 1962, Lunenfeld y col. observaron que las mujeres amenorreicas hipogonadotrópicas requerían 120-240 mg equivalentes a la IRP para estimular la producción ovárica de estrógenos.

Sobre la base del contenido de hMG de la IRP (120 mg IRP = 6.8 mg hMG) esto equivaldría a 6.8-13.6 mg de hMG. Seguidamente, se reportó el uso exitoso de hMG como estimulante de la ovulación y del embarazo en mujeres amenorreicas hipogonadotrópicas; el tratamiento utilizado fue de tipo secuencial, pasando de un régimen alto a uno más bajo. El patrón hormonal durante la fase folicular, la ovulación, la fase lútea y el embarazo se muestran en la Figura 3D.

Luego de que la inducción exitosa de la ovulación y del embarazo fueron demostrados en mujeres amenorreicas con hipopituitarismo e hipogonadismo, Pergonal® 75 fue registrado por Sero en Israel en 1963, y en Italia en 1965. Una preparación similar, llamada Humegon®, fue producida por Organon en Holanda en 1963.

**En 1973, se elaboraron las primeras guías de diagnóstico y manejo de parejas infértiles por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estas recomendaban una dosis diaria efectiva de 150-225 UI de hMG para pacientes hipogonadotrópicas (grupo OMS I), y 75-150 UI para pacientes anovulatorias normogonadotrópicas (grupo OMS II).**

Estas guías también resaltaron que la relación FSH/LH variaba de manera distinta en las preparaciones de hMG y HPG, y que existía evidencia suficiente para indicar que las relaciones de 0.1-10.0 eran aceptables, siempre y cuando se administrara una dosis suficiente de FSH. Actualmente, la variabilidad aceptada en la farmacopea para las gonadotropinas es de 20% a 25% (por ejemplo, un vial de 75 UI de hMG puede contener 80% a 125% de FSH o LH).

El uso de hMG en mujeres con anovulación, hipopituitarismo, hipogonadotropismo y amenorrea primaria, inducía cambios en el endometrio y el epitelio vaginal, así como la inducción de la secreción de esteroides.

La variabilidad aceptada en la farmacopea para las gonadotropinas es de 20% a 25%.

En 1981, siguiendo los estudios pioneros de Steptoe y Edwards, en los se usaban los ciclos naturales de FIV, Howard y Georgeanna Jones establecieron los protocolos de hMG/hCG, que fueron descritos por Lunenfeld y col. en 1963 como el abordaje estándar para la estimulación de la ovulación y la inducción en la TRA. Estos protocolos luego fueron revisados, y el estándar para la estimulación ovárica en la TRA pasó a ser la producción de folículos múltiples, en vez de un desarrollo monofolicular. Las cancelaciones frecuentes del ciclo se asociaron con estos protocolos, producto del aumento de LH y la luteinización folicular prematuros. **Esto se abordó con el uso de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para inhibir la hipófisis durante la estimulación ovárica con hMG.**

La hMG urinaria altamente purificada (HP-hMG) fue aprobada para la venta en Europa en 2004, y se extrae de orina menopáusica mediante protocolo de purificación de 8 pasos.

---

A pesar de su elevada pureza, esto genera la pérdida de la actividad de la LH, por lo cual se decidió agregar hCG para reestablecer la relación FSH/LH.

---

Debido a esto, la HP-hMG contiene aproximadamente 30% de impurezas identificadas, las cuales varían entre cada lote.

---

La LH y la hCG son diferentes desde el punto de vista molecular, funcional y clínico. A diferencia de la LH, la hCG solo se produce en embarazadas, y cuando es utilizada en mujeres no embarazadas tiene una vida media más larga, lo que resulta en su acumulación en sangre periférica. Además, la hCG tiene un efecto muy diferente en las células de la granulosa en comparación con la LH, ya que inhibe el receptor de LH; su efecto en la producción de cAMP es más potente, y menos potente en la quinasa regulada extracelularmente, así como en la quinasa B.

---

### ***Purificación de FSH a partir de hMG***

A pesar de la disponibilidad de preparaciones de hMG, los médicos querían tener la capacidad de dosificar FSH y LH de acuerdo con las características específicas de cada paciente. Fueron propuestos diversos métodos para purificar FSH a partir de hMG, pero ninguno pudo ser utilizado a gran escala; **esto solo se hizo posible cuando hubo avances en las técnicas inmunológicas que permitieron la preparación de anticuerpos específicos para FSH o LH.**

Inicialmente, en 1960, se generaron anticuerpos policlonales anti-hCG y fueron usados para producir una columna de afinidad y, así, remover la LH de la hMG. La FSH eluida podía ser purificada y liofilizada de la misma manera en que se realizaban las preparaciones de hMG anteriores. Esto generó un producto (Metrodin®, urofolitropina) que contenía 150 UI de FSH y 1 UI de LH por miligramo de proteína. Sin embargo, una gran proporción de las proteínas urinarias no gonadotrópicas se mantenían en la muestra.

Posteriores avances permitieron el reemplazo de los anticuerpos policlonales por anticuerpos monoclonales altamente específicos contra FSH. En estas técnicas, se pasaba la hMG por una columna de afinidad que contenía los anticuerpos monoclonales selectivos para moléculas de FSH; todas las proteínas urinarias y la LH que no se unían a la columna eran removidas. Posteriormente, la FSH era extraída de la columna, lo cual permitía la obtención de un producto de FSH altamente puro, con una mínima cantidad de LH u otras proteínas contaminantes. El producto final (Metrodin-HP®, urofolitropina altamente purificada) contenía < 0.1 UI de actividad de LH y < 5% de proteínas urinarias no identificadas, mientras que habían 9000 UI de FSH por miligramo de proteína. **El contenido de FSH por miligramo en Metrodin-HP® era 60 veces más alto, en comparación con el de Metrodin®, y la proporción de proteínas urinarias no gonadotrópicas era significativamente más baja.** Esta mejora implicaba que **Metrodin-HP® podía ser inyectado de forma subcutánea en vez de intramuscular**, como se habían inoculado todas las preparaciones de gonadotropinas anteriores.

A medida que la demanda de gonadotropinas aumentaba, la falta de fuentes suficientes de orina menopáusica se hizo más aparente. En el año 2000, se necesitaron 120 000 000 l de orina a partir de 600 000 donantes para suplir la demanda, y se tuvieron que aplicar mayores medidas de seguridad puesto que no era posible evaluar individualmente a cada mujer donante. Luego de los reportes que asociaban la incidencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en mujeres con el tratamiento con HPG, las proteínas priones fueron identificadas en la orina de estas pacientes. Esto generó preocupación por la posibilidad de que el tratamiento con hMG generara una transmisión similar de priones.

Debido a esto, diversos países publicaron resoluciones para reemplazar las gonadotropinas urinarias con recombinantes, lo cual haría que estas fuesen más puras y seguras para las pacientes.

### ***Gonadotropinas recombinantes***

La FSH humana (hFSH) recombinante fue desarrollada para reducir la variabilidad y dependencia inherentes de la fuente, que se generaba al

producirla a partir de orina. **Debido a que la glucosilación de la hFSH es muy importante para su función, las moléculas recombinantes debían ser producidas en líneas celulares de mamífero, las cuales contienen las enzimas necesarias para esta modificación postraduccional.** Por esto, la hFSH recombinante fue expresada por primera vez en células provenientes de ovario de hámster chino (CHO, por su sigla en inglés), la línea celular estándar para la producción de compuestos biológicos en esos tiempos.

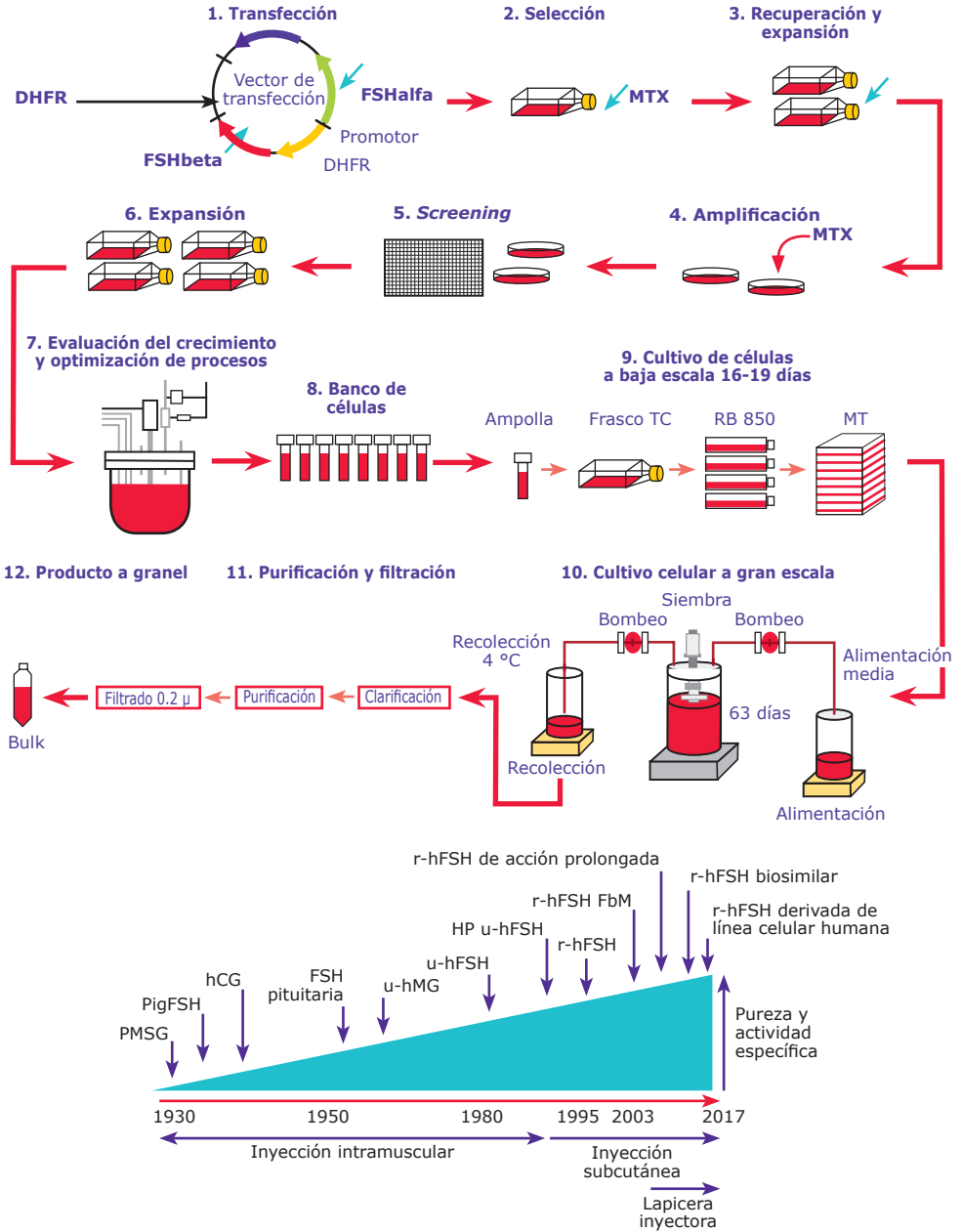
Durante el desarrollo de la hFSH, los clones eran seleccionados sobre la base de su actividad, consistencia de producción y patrón de glucosilación. Era importante utilizar líneas celulares estables que pudiesen expresar el producto en cantidades abundantes, para así evitar cambios en el producto en el tiempo. **El patrón de glucosilación de las gonadotropinas varía durante el ciclo menstrual, por lo cual la glucosilación de la hFSH recombinante también debía ser seleccionada.** Luego de proponer el uso de 3 preparaciones diferentes para hFSH recombinante (con perfiles de glucano que representaran el inicio, el medio y el final del ciclo menstrual) se decidió producir solo la hFSH recombinante con el patrón de glucosilación del medio del ciclo, por ser la más bioactiva.

La hFSH recombinante producida es altamente pura (99%) y tiene un patrón de glucosilación más homogéneo, en comparación con las preparaciones urinarias e hipofisarias de FSH o de hMG. El proceso de producción permite una alta coincidencia entre lote y lote, tanto en el perfil de isoformas como en la distribución de las especies glucosiladas.

**Esta alta pureza permite que se determine la bioactividad a través de análisis fisicoquímicos, y que los viales sean descritos por masa proteica y no por actividad específica, lo cual reduce la variación entre cada lote al 2%.** Además, esta alta pureza reduce la posibilidad de oxidación, lo que permite que la producción sea en forma líquida, lo cual es usado para generar dispositivos inyectables que contienen el producto.

La primera hFSH recombinante (folitropina alfa) de uso clínico fue producida por Laboratorios Merck.

Para determinar la bioactividad de estos productos, se tuvo que establecer un factor de conversión de la actividad biológica basado en el bioensayo de Steelman-Pohley y los microgramos contenidos. Este bioensayo determina la actividad de FSH en una muestra de gonadotropina comparando el peso de los ovarios de ratas inma-



**Figura 4.** (A) Desarrollo y producción de productos recombinantes en células CHO deficientes en dihidrofolato, y (B) línea de tiempo del desarrollo de gonadotropinas.

DHFR, dihidrofolato reductasa; FbM, llenado por masa; FSH, hormona foliculoestimulante; hCG, gonadotropina coriónica humana; HP, altamente purificado; MTX, metotrexato; PMSG, gonadotropina de suero de yegua preñada; Q.C.; control de calidad; r-hFSH, FSH humana recombinante; TC, cultivo de tejido; u-hFSH, FSH humana urinaria; uhMG, gonadotropina menopáusica humana urinaria.

duras inyectadas diariamente con una muestra de FSH y hCG por 3 días. Luego se calculan las tasas de potencia, basándose en curvas de dosis-respuesta. Esto tomó 2 años para la producción, el análisis y la validación clínica de los distintos lotes de folitropina alfa. **Este trabajo determinó que la hFSH recombinante tiene una bioactividad de 13 745 UI/mg de proteína, lo que equivale a un factor de conversión de 75 UI por 5.5 mg de FSH** (Figura 4).

La primera hFSH recombinante (folitropina alfa) de uso clínico fue producida por Laboratorios Serono (ahora Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en 1988, y fue aprobada para la venta en la Unión Europea en 1995. Una hFSH recombinante similar (folitropina beta) fue producida por Organon (ahora Merck & Co., Kenilworth, NJ) y se aprobó para la venta en 1996. Estos dos productos son similares, pero presentan diferencias bioquímicas en su producción. La folitropina alfa es producida usando dos plásmidos para generar la línea celular productora de FSH, uno que contiene la secuencia genómica de la subunidad A y otro que contiene la subunidad B. En cambio, la folitropina beta es producida utilizando un solo plásmido que codifica para ambas subunidades. Además, los procesos de purificación difieren en las técnicas usadas: la folitropina beta es purificada con cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba y de exclusión por tamaño, mientras que la folitropina alfa es purificada usando todas estas técnicas más un paso adicional basado en inmunoafinidad.

---

Luego de la producción exitosa de la hFSH recombinante, se utilizó un proceso similar para producir LH humana (hLH) recombinante y hCG recombinante.

---

En 1997, Agarwal y col. reportaron el primer nacimiento en una mujer con hipopituitarismo e hipogonadotropismo (grupo OMS I) tratada con hFSH y hLH recombinantes para estimular el crecimiento folicular, y hCG recombinante para inducir la ovulación. En 2016 se utilizaron aproximadamente 100 millones de unidades de gonadotropina, y se estima que esta cantidad va a continuar aumentando en un 6% cada año hasta 2025 (números basados en los datos de IMS MIDAS de IQVIA).

Actualmente se encuentran disponibles dos versiones biosimilares de hFSH recombinante: Ovaleap® (Teva B.V., Haarlem, Holanda) recibió aprobación para la venta en Europa en 2013, y Bemfola® (Afolia, Finox Biotech AG, Balzers, Liechtenstein), que recibió la aprobación en 2015. En diciembre de 2016, una nueva hFSH recombinante, folitropina delta (Rekovel, Ferring Pharmaceuticals, Saint Prex, Suiza), producida a partir de la línea celular derivada de retina humana (PER.C6), recibió aprobación para la venta en Europa. La estructura peptídica es la mis-

ma que la de las preparaciones anteriores, pero el patrón de glicanos es diferente. Esto resulta en diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas, lo cual causa mayor exposición, en comparación con la folitropina alfa.

### ***Gonadotropinas de larga duración***

**La FSH tiene una vida media biológica relativamente corta (24 horas), y se requieren inyecciones diarias durante varios días para un tratamiento de fertilidad.** Debido a esto, existe mucho interés en producir versiones con una vida media más larga, lo cual disminuiría la duración del tratamiento. Una de las opciones estudiadas fue la de generar un producto hiperglucosilado (GM1-Serono).

Este compuesto se mantenía en la sangre durante 5 días; sin embargo, el desarrollo de este producto fue discontinuado. Otra propuesta fue utilizada para la elaboración de corifolitropina alfa (Elonva®, Merck & Co.), la cual contiene una subunidad B fusionada con el componente CTP de la subunidad B de hCG, que reduce su metabolismo y permite que este compuesto se mantenga en la sangre durante 7 días. La corifolitropina alfa fue aprobada en 2010 en Europa, y no se han observado diferencias en las tasas de nacimiento para dosis medias (150-180 mg), en comparación con el tratamiento diario con FSH.

En conclusión, el desarrollo de gonadotropinas ha sido un proceso enfocado en la producción de productos de alta pureza que fueran seguros y eficaces. Se estima que su uso para la inducción de la ovulación y para las TRA ha permitido el nacimiento de más de 15 millones de niños. Los productos actualmente disponibles pueden ser inyectados de forma subcutánea en vez de intramuscular, y también como dispositivos inyectables, eliminando la necesidad de reconstituir el producto antes de la inyección y, así, facilitando su aplicación. Esto ha permitido que el tratamiento de fertilidad sea personalizado, utilizando preparaciones puras de gonadotropinas (hFSH, hLH y hCG recombinantes) al inicio y durante la estimulación ovárica, con la finalidad de maximizar su seguridad y eficacia.

El proceso del desarrollo de gonadotropinas se ha enfocado en la producción de productos de alta pureza que fueran seguros y eficaces

Sin embargo, los esfuerzos para desarrollar nuevas preparaciones aún continúan. Existe mucho interés en elaborar agonistas y antagonistas orales para la FSH, puesto que esta hormona no puede ser absorbida de manera oral, aunque todas las preparaciones generadas hasta el día de hoy no han sido efectivas.





## 5. Progreso de la estimulación ovárica para FIV

En 1978 nació el primer bebé por FIV realizada en un ciclo menstrual natural sin estimulación exógena. Poco después, la estimulación ovárica se convirtió en el estándar de atención en la FIV clínica. En general, se cree que comenzar la fase de laboratorio de la FIV con múltiples ovocitos recuperados después de la estimulación ovárica compensa de manera efectiva la fertilización subóptima de los ovocitos y el desarrollo de embriones *in vitro* y, por lo tanto, es obligatorio para un programa de FIV exitoso.

### *Perspectiva histórica de la estimulación ovárica*

A principios de 1980 se informaron en Australia los primeros nacimientos después de la FIV en ciclos estimulados con citrato de clomifeno. Luego, en EE.UU. se utilizaron las gonadotrofinas urinarias para las FIV después de múltiples intentos fallidos de FIV de ciclo natural.

Asociado con el desarrollo continuo de múltiples folículos y la producción suprafisiológica de estradiol (E2), se produjo un aumento prematuro de los niveles de LH y de progesterona, lo que generó resultados no favorables de FIV. Por esta razón, la regulación a la baja de la síntesis de gonadotropina endógena resultante de la coadministración de agonistas de la GnRH se introdujo a finales de los ochenta y rápidamente se convirtió en el estándar de atención.

La duración de los protocolos de estimulación aumentó de forma significativa porque la estimulación tuvo que posponerse debido al efecto estimulante inicial de los agonistas de la GnRH sobre la liberación de gonadotropina hipofisaria. En los últimos años, los médicos fueron cambiando del tratamiento con agonistas de la GnRH a los antagonistas de la GnRH introducidos más recientemente.

Debido a la unión competitiva al receptor de la GnRH, los efectos supresores de los antagonistas de la GnRH son inmediatos. Por lo tanto, la estimulación ovárica se puede iniciar temprano durante el ciclo menstrual normal, lo que hace que la estimulación sea más corta y más agradable para la paciente. Un metanálisis demostró tasas similares de éxito de la FIV con el uso de antagonistas de la GnRH o de agonistas de la GnRH, que coincidían con menor consumo general de gonadotropinas y tasas reducidas de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).

La fase lútea es anormal después de la estimulación ovárica, según descubrió el profesor Bob Edwards en la década de 1970 cuando utilizó citrato de clomifeno para la estimulación. Aunque el aporte suplementario en la fase lútea (predominantemente mediante la administración diaria de progesterona) se aplica ampliamente, la verdadera razón subyacente a la función lútea anormal sigue siendo insuficiente.

La tecnología de ADN recombinante permitió la producción masiva de hFSH recombinante

En años recientes, además de los productos urinarios purificados, la tecnología de ADN recombinante permitió la producción masiva de hFSH recombinante, una quimera de FSH de acción prolongada, LH recombinante y hCG. Se han desarrollado numerosos regímenes diferentes de estimulación ovárica utilizando gonadotropinas exógenas que

combinan múltiples preparaciones, diferentes días de inicio de estimulación, así como diferentes dosis en regímenes fijos o flexibles dependiendo de la respuesta ovárica observada.

Por otra parte, el número óptimo de ovocitos a recuperar sigue siendo un tema de debate. Muchos médicos consideran que entre más ovocitos, mayores tasas de embarazo por FIV. El objetivo debe ser ajustar la dosis de estimulación de tal manera que se desarrolle el número óptimo de folículos ya que las posibilidades de presentar SHO están directamente relacionadas con la cantidad de folículos en desarrollo. Dado que las formas graves de SHO a menudo coinciden con el embarazo, se han recomendado enfoques para segmentar la FIV, separando en el tiempo la fase de estimulación de la FIV de la transferencia de embriones. Esta estrategia de congelación total solo transfiere embriones congelados-descongelados en ciclos naturales o artificiales posteriores.

### ***Estimulación ovárica en mujeres con baja respuesta ovárica***

Desde los primeros días de la estimulación ovárica para la FIV se hizo evidente que las mujeres no responden de la misma forma, ya que algunas presentan una respuesta ovárica reducida, caracterizada por niveles más bajos de E2 y un número bajo de ovocitos recuperados, lo que se asocia con tasas de embarazo significativamente menores. La evidencia disponible, indicó resultados muy decepcionantes en la mejora de la probabilidad de embarazo. En un primer metanálisis, la adición de la hormona del crecimiento (GH) a los protocolos de estimulación ovárica parecía bastante prometedora. Otro grupo de sustancias que se ha planteado como potencialmente beneficiosas para mejorar la re-

spuesta ovárica deficiente son los andrógenos o agentes moduladores de andrógenos. Hallazgos de un metanálisis confirman que el pretratamiento con testosterona se asocia con tasas de embarazo clínico y de nacidos vivos significativamente más altas, una dosis total de gonadotropinas significativamente más baja y una cantidad significativamente mayor de ovocitos recuperados.

### ***Los desafíos actuales de la estimulación ovárica en perspectiva***

Aunque las posibilidades de embarazo de un solo ciclo de FIV de estimulación ovárica serán mayores en comparación con la FIV de ciclo natural, no se pueden ignorar algunos inconvenientes de la estimulación ovárica, como la complejidad de los regímenes y los problemas resultantes del cumplimiento del paciente; el costo alto de los medicamentos; la necesidad de una monitorización intensa de la respuesta ovárica que requiere visitas frecuentes al hospital, ecografías y evaluaciones endocrinas en sangre; los efectos secundarios relacionados con los agonistas de la GnRH; el riesgo de presentar SHO, entre otros.

Para eludir estos efectos negativos de la estimulación ovárica a nivel del endometrio, se ha defendido la estrategia de congelación total, en la que solo se transfieren embriones congelados-descongelados en ciclos posteriores. Después del cotratamiento con antagonistas de la GnRH durante la estimulación ovárica, la maduración final de los ovocitos al final de la fase folicular también puede ser inducida por una dosis en bolo de un agonista de la GnRH que eleva los niveles de LH y FSH. Se ha recomendado el aporte suplementario con dosis bajas de hCG en la fase lútea, aunque este enfoque introduce nuevamente el riesgo de presentar SHO. Los pros y los contras de este abordaje deben equilibrarse con la estrategia de congelamiento total.

El concepto de que la estimulación ovárica profunda es un requisito previo para un programa de FIV exitoso, ha sido cuestionado por algunos especialistas en los últimos años. Cuando se consideran resultados acumulativos que involucran transferencias frescas y congeladas de un ciclo de FIV dado, o incluso múltiples ciclos de FIV durante un período determinado, se han informado tasas de nacidos vivos similares después de la estimulación leve, en comparación con la convencional. Una revisión sistemática reciente demostró tasas de embarazo comparables, costos reducidos y tasas de SHO reducidas en mujeres con estimulación ovárica leve (respondedoras normales frente a respondedoras bajas).



## 6. Agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas en el contexto de la estimulación ovárica controlada para desencadenar la ovulación

La administración repetida de agonistas de la GnRH produce supresión hipofisaria (regulación a la baja). Aunque posteriormente se demostró que la secreción continua de fragmentos de la subunidad alfa de gonadotropina producía una estimulación continua del receptor de GnRH y un mecanismo de supresión posreceptor, el término regulación a la baja se arraigó en la literatura, aunque el término adecuado es desensibilización.

En los años ochenta, uno de los inconvenientes más importantes con los que se tuvo que lidiar en la FIV fue la incidencia de ovulación (del 20% al 30%) antes de la recuperación de los ovocitos. Por esta razón, varios médicos empezaron a utilizar acetato de leuprolida para bloquear la ovulación, aunque su uso no estaba indicado –lo que se mantiene hasta el día de hoy–. En 1989, se propuso que la supresión de la GnRH se utilizara de forma rutinaria. Una ventaja adicional de la supresión de agonistas antes de la estimulación ovárica, era que la duración de la supresión podía variar, lo que ofrecía a las pacientes y al centro de FIV la posibilidad de programar ciclos.

Desde ese uso temprano de agonistas, debido a la introducción de la FSH, y con el objetivo de eliminar el uso de hMG en orina, una de las principales inquietudes fue si la estimulación podría ser igualmente efectiva con solo FSH. Durante los siguientes años se determinó que había un beneficio pequeño, pero significativo, en la tasa de nacidos vivos con el uso de FSH y LH, en comparación con FSH sola.

Se determinó que había un beneficio pequeño, pero significativo, en la tasa de nacidos vivos con el uso de FSH y LH

Con los agonistas de la GnRH, aunque se eliminaron los aumentos prematuros de LH durante la FIV, también se produjo desensibilización de los receptores de GnRH hipofisarios, lo que impidió la inducción de un aumento repentino de gonadotropinas. En 1994, el antagonista de la GnRH se introdujo en protocolos de estimulación ovárica controlada

para prevenir aumentos repentinos de LH no deseados. Sin embargo, se volvió a poner los ojos en los agonistas de la GnRH para prevenir el SHO en mujeres que tenían una respuesta excesiva a la estimulación y por una mayor afinidad por los receptores de GnRH que los antagonistas de la GnRH. Esta capacidad del agonista de desplazar al antagonista del receptor dando como resultado la liberación de LH y FSH, permite la maduración final del folículo en ciclos de antagonista de la GnRH (la primera investigación publicada en el año 2000 se realizó en ciclos de FIV sobreestimulados para prevenir el SHO, y luego se confirmó en ciclos de respuesta normal).

Rápidamente se hizo evidente que la activación del agonista de la GnRH junto con el antagonista de la GnRH se asociaba con fases lúteas inadecuadas y tasas de embarazo más bajas con la transferencia de embriones frescos. Sin embargo el efecto luteolítico de este protocolo fue beneficioso en la prevención del SHO, como muestran varias publicaciones. La causa de los defectos de la fase lútea no estaba clara, pero la especulación varió entre la desensibilización hipofisaria con deficiencia central de LH *versus* un efecto directo del agonista de la GnRH sobre la esteroidogénesis lútea. La evidencia apoya un efecto central más que una desensibilización hipofisaria.

En la actualidad, el uso principal del desencadenante agonista de la GnRH es prevenir el SHO en mujeres que presentan una hiperrespuesta a la estimulación con gonadotropinas en protocolos de antagonistas de la GnRH. Es probable que el mecanismo sea tanto a través de la luteólisis como de la liberación del factor derivado del epitelio pigmentario de las células de la granulosa lútea, y la consiguiente inhibición de la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular.

La receptividad endometrial se puede preservar agregando dosis bajas de hCG para el apoyo lúteo o agregando dosis altas de estrógeno y progesterona para mantener el endometrio. Sin embargo, la estrategia más común es la segmentación del ciclo mediante la congelación de todos los embriones para su transferencia en un ciclo posterior.

## 7. Selección de pacientes

### ¿Dónde estamos hoy?

En los seres humanos, la reproducción es ineficaz en comparación con otras especies (probabilidad de concepción durante un ciclo menstrual 30% frente al 95% en roedores y el 96% en conejos), y solo el 60% de todas las concepciones avanzan más allá de las 20 semanas de gestación.

La evolución de la medicina reproductiva ha sucedido muy rápido y ha integrado los conocimientos desarrollados en los laboratorios de endocrinología, embriología, ciencias de la reproducción y endoscopia, combinándolos con la creación y disponibilidad de varios fármacos para la estimulación ovárica.

Posteriormente, se han implementado la ICSI, el DGP y la criotecnología. A pesar de todos estos avances tecnológicos, cuando un blastocisto morfológicamente normal se transfiere a un útero aparentemente normal en la FIV, el éxito del ciclo reproductivo es muy limitado y no ha aumentado significativamente desde la década de 1990.

El éxito final de la implantación del embrión depende tanto de este como del endometrio (factor endometrial). La progesterona es la hormona más importante que controla el inicio y el curso del embarazo en los seres humanos; la abstinencia de progesterona es el “desencadenante” de la menstruación en los ciclos de no embarazadas. La progesterona induce la adquisición de un estado funcional transitorio de 12 a 48 horas por parte del epitelio endometrial, conocido como ventana de receptividad o ventana de implantación (VI).

La progesterona es la hormona más importante que controla el inicio y el curso del embarazo en los seres humanos.

La principal diferencia entre los seres humanos y las especies que no menstrúan radica en el control decidual de la implantación humana frente al control embrionario de la implantación de roedores. Esta preponderancia del embrión que dirige la implantación está ejemplificada por el proceso de implantación retardada, que no está presente en los seres humanos.



## Logros destacados hacia la comprensión del factor endometrial: ¿Cómo llegamos aquí?

La primera clasificación objetiva del endometrio fue realizada por Noyes y col. y publicada en 1950 en *Fertility and Sterility*. Este artículo, citado 2606 veces, inició la era de la medicina anatómica para el factor endometrial. Cincuenta años después, la precisión, la reproducibilidad y la relevancia funcional de la evaluación histológica como predictor de la receptividad endometrial, o incluso de la fertilidad, fueron cuestionadas en estudios aleatorizados.

Aunque el descubrimiento de Noyes de la transformación endometrial a través del ciclo menstrual fue fundamental para comprender la función endometrial, no fue precisa para predecir la implantación. En consecuencia, la histología del endometrio no se incluye en el estudio clínico estándar de infertilidad actual, aunque sigue siendo relevante para el diagnóstico de malignidad o endometritis.

Los conceptos de receptividad endometrial y la existencia de una VI fueron sugeridos por primera vez por Hertig y Rock en 1956.

Los conceptos de receptividad endometrial y la existencia de una VI fueron sugeridos por primera vez por Hertig y Rock en 1956. En su estudio, los autores recuperaron 84 embriones antes y después de la implantación (conocidos en ese momento como óvulos humanos fertilizados) de 210 pacientes de fertilidad conocida (1-14 niños). Se encontraron un total de 34 embriones que iban desde la etapa de escisión de 2 células hasta un blastocisto de implantación de 17

días (denominado óvulo veloso implantado en la decidua temprana). La conclusión fue que el 30% de los embriones eran "anormales", y que la implantación embrionaria se produce alrededor del día 20 en un ciclo menstrual regular, lo que demostró por primera vez el concepto de VI.

En la década de 1980, se desarrollaron dos avances técnicos de importancia crítica en imágenes diagnósticas: la histeroscopia y la ecografía transvaginal. Desde entonces, han evolucionado con mejoras significativas para identificar la patología uterina, aunque no para predecir la receptividad endometrial. En 1986, la introducción de la ecografía transvaginal para la aspiración de ovocitos popularizó esta técnica para la visualización directa del endometrio y la cavidad endometrial antes, durante y después de la estimulación ovárica controlada, así como posteriormente para colocar el embrión en la posición correcta en la cavidad endometrial.

Debido a su resolución, bajo costo, falta de exposición a radiación ionizante y mejor técnica para la obtención de imágenes tridimensionales,

es hoy en día el único examen de diagnóstico requerido para la evaluación del factor endometrial. Sin embargo, no es suficiente para predecir la normalidad molecular endometrial y el potencial de implantación.

En la década de 1990, con el uso del modelo de donación de óvulos, se demostró la VI clínica, que se refiere al marco de tiempo en el que el embrión debe ser transferido al útero. La receptividad endometrial se evaluó reemplazando embriones de 2 a 12 células (días 2 a 4 de desarrollo embrionario) entre los días 16 y 24 de ciclos definidos hormonal e histológicamente. De 37 procedimientos de transferencia de embriones en los días del ciclo 17-19, se produjeron 15 concepciones (40.5%), mientras que de 11 pacientes transferidas en los días 20-24, ninguna concibió. De manera similar, no se lograron embarazos con cuatro transferencias en el día 16 del ciclo.

El trabajo adicional de Wilcox y col. en 1999, popularizó el concepto de que el embrión humano se implanta entre 8 y 10 días después de la ovulación, la cual se identificó mediante los cambios en la excreción urinaria de metabolitos de E2 y de progesterona, medidos por radioinmunoensayo. Casi 20 años después, no se ha adoptado el método anterior para determinar la ovulación. Se desconoce la diferencia de tiempo entre esa prueba temprana de metabolitos urinarios y la prueba de sangre del pico de LH utilizada para predecir la ovulación.

Las estimaciones reales en los ciclos de TRA indican que la VI se centra a los 5 días después de la administración de progesterona endógena o exógena; en un ciclo natural, ocurre de 6 a 7 días después de la ovulación. Sin embargo, los médicos y científicos han adoptado un marco de tiempo permisivo en todas las pacientes con el mismo éxito de implantación durante 3 días, independientemente de las variaciones individuales o del tratamiento hormonal recibido (es decir, ciclos naturales, estimulación ovárica controlada, ciclos de reemplazo hormonal). Estas son las razones históricas por las que la transferencia de embriones se suele realizar cuando el embrión está listo, asumiendo que el endometrio de la madre está sincronizado con el embrión, aunque se ha demostrado que esta sincronía no se puede asumir.

En 1990, Barker resaltó la influencia del endometrio materno con el embrión y luego con el feto y la vida adulta. Debido a que los cambios epigenéticos contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades complejas, es importante identificar y modificar los cambios intrauterinos que pueden mediar en la programación del embrión en desarrollo que afectará en la edad adulta.

Hace solo dos décadas que se produjo la transición de la medicina anatómica a la molecular en el diagnóstico de la función endometrial. En un principio fue investigado el nivel bioquímico y molecular único, sin éxito. Todas las posibles moléculas y receptores con expresión relacio-

nada con la VI fueron evaluadas, sin traducción clínica congruente. Sin embargo, la búsqueda de una característica transcriptómica de la receptividad endometrial fue un punto de inflexión importante en la comprensión de esta función. Un trabajo de Peter Rogers y col. demuestra la viabilidad de la clasificación molecular del endometrio con el uso de perfiles transcriptómicos a lo largo del ciclo menstrual y el período de receptividad/VI. En 2011 se informó que la característica transcriptómica de la receptividad endometrial humana es de 238 genes, lo que llevó a la creación del análisis de receptividad endometrial. Este análisis molecular ahora se realiza con el uso de NGS junto con un algoritmo y un predictor computacional capaz de identificar la VI de forma individualizada, independientemente de la apariencia histológica de su endometrio. Ahora tenemos las herramientas para mejorar la sincronía entre el embrión y el endometrio: cuando ambos están listos, la implantación es más exitosa.

Por último, tras un minucioso trabajo en varios modelos con animales, el trasplante de útero es ahora una realidad desde que el grupo Brannström logró el primer nacido vivo con éxito tras un trasplante de útero. Este último hito en la medicina reproductiva conduce a nuevas soluciones terapéuticas para el tratamiento de la infertilidad por factor uterino.

Actualmente hay varias necesidades insatisfechas en la investigación de la biología endometrial que se están acercando a la traducción clínica. Las innovaciones tecnológicas provienen de tres campos disruptivos: genética, investigación/bioingeniería de células madre y nanotecnología. El pronóstico es que las mejoras en el factor endometrial estarán impulsadas por la aplicación con el uso de técnicas de vanguardia, en lugar de ser impulsadas por la tecnología.

---

La búsqueda de biomarcadores en líquidos biológicos se ha convertido en una alternativa eficaz a los métodos diagnósticos invasivos clásicos. El estudio secretómico del líquido endometrial iniciado por el grupo de Nick Macklon puede abrir un nuevo campo para el diagnóstico no invasivo de la función endometrial.

---

Además, el reciente advenimiento de la NGS, rentable y escalable, junto con el conocimiento de los genomas bacterianos, ha facilitado el descubrimiento de microbiomas únicos en ambientes anatómicos previamente considerados estériles. El estudio del microbioma endometrial en pacientes candidatas a FIV ha revelado que las comunidades bacterianas pueden tener un impacto en el éxito reproductivo; espe-

cíficamente, se ha propuesto la presencia de poblaciones de bacterias disbióticas o patógenas como una causa emergente de fallos de implantación repetidos o abortos espontáneos recurrentes. Esta área podría conducir a un tratamiento “probiótico” para corregir un microbioma endometrial anormal y mejorar el resultado reproductivo. Por otra parte, la terapia regenerativa también ha avanzado y es posible utilizarla en el endometrio.

Comprender el endometrio, el entorno uterino y su contribución colabora con el resultado exitoso de un embarazo y con la salud a largo plazo de las generaciones futuras.

Los textos de **Fertilización *in vitro*: 40 años de historia** fueron tomados de Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, et al. Forty years of IVF. *Fertil Steril* 110(2):185-324, Jul 2018, y fue resumido objetivamente por el Comité de Redacción Científica de SIIC. El contenido es responsabilidad de los autores que escribieron los textos originales. Los médicos redactores no emiten opiniones o comentarios sobre los artículos que escriben. Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio o soporte editorial sin previa autorización expresa de SIIC. Impreso en la República Argentina, julio de 2021. Registro Nacional de la Propiedad Intelectual en trámite. Hecho el depósito que establece la Ley N° 11723.