

**VEINTICINCO AÑOS DE REPRODUCCIÓN HUMANA
ASISTIDA EN EL PERÚ
TWENTY FIVE YEARS OF HUMAN ASSISTED
REPRODUCTION IN PERU**

Guillermo Llerena Cano
gllerena@fertilidadperu.com
Director de la Fundación PRANOR. Lima, Perú.

Recibido: 22 de julio de 2014

Aceptado: 25 de agosto de 2014

SUMARIO

Introducción

La tecnología de reproducción humana asistida en el Perú

RESUMEN

En Perú, se realizaron los primeros procedimientos de reproducción humana asistida (RHA) en 1989 por el Grupo PRANOR. Veinticinco años más tarde, en 2014, la secuencia de desarrollo de esta tecnología se revisa, identificándose a nivel mundial los hitos principales del desarrollo.

En este trabajo, dos períodos de desarrollo tecnológico de la RHA en Perú se fijan, el primero entre 1989 y 1998, y el segundo entre 1999 y 2014; definiéndose conceptos, técnicas y terminología específica para facilitar su comprensión.

PALABRAS CLAVES

Reproducción humana asistida; desarrollo científico tecnológico; diagnóstico genético pre implantacional.

ABSTRACT

In Peru, the first procedures of assisted human reproduction (AHR) were performed in 1989 by the PRANOR Group. Twenty-five years later, in 2014, the sequence of development of this technology is reviewed, identifying globally the top developmental milestones.

In this paper, two periods of technological development of the RHA in Peru are set, the first between 1989 and 1998, and the second between 1999 and 2014; defining concepts, techniques and specific terminology for ease of understanding.

KEYWORDS

Assisted human reproduction; scientific and technological development; pre-implantation genetic diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX, muchos fisiólogos comenzaron a centrar su interés científico en los procesos de fecundación y desarrollo embrionario temprano en mamíferos. En este periodo, el concepto de “huevo de mamífero” propuesto por William Harvey a mediados del siglo XVII, que unificaba de manera genérica todas las fases de desarrollo previas a la implantación del blastocisto en la pared interna del útero, comenzaba a perder vigencia, debido a que ya no satisfacía la necesidad de información que los nuevos embriólogos exigían para interpretar el desarrollo preimplantacional en los mamíferos.

La primera etapa de estas investigaciones consistió en disecciones o perfusiones de los oviductos de pequeños roedores silvestres, buscando en su contenido los diferentes estados de desarrollo, describiéndolos de acuerdo a la apariencia de su envoltura y al número y forma de las células que los conformaban. Más adelante, en una segunda etapa, trabajando con animales criados en los laboratorios se incluyó información sobre el tiempo pasado desde el apareamiento. De esta manera fue posible confeccionar un calendario de desarrollo preimplantacional, que resultó ser bastante similar en casi todas las especies de mamífero estudiadas.

En una tercera etapa de estudios de desarrollo embrionario preimplantacional en mamíferos, se trató de lograr que los embriones recuperados en estados más tempranos progresaran en condiciones de laboratorio. Para esto, ya se contaba con algunas soluciones acuoso-salinas fisiológicas, que incluso eran suplementadas con fuentes de proteína animal como la clara de huevo y el suero sanguíneo. Para entonces y de manera paralela, también se realizaban estudios sobre los cambios en la estructura y función de los espermatozoides antes y durante la fecundación.

Los primeros resultados de todas estas investigaciones fueron bastante desalentadores, hasta que a mediados del siglo XX consiguieron resultados tan propicios que indujeron a trasplantar embriones de ratón desarrollados *in vitro* dentro de la cavidad uterina de ratonas preparadas. El éxito de estas pruebas fue determinante para que pocos años después se lograra el nacimiento de ratones a partir de fecundación y desarrollo preimplantacional *in vitro*.

La consecuencia natural de esta secuencia de éxitos científicos fue que, en los primeros años de la década de 1960, el biólogo británico Robert Edwards, premio Nobel en medicina y fisiología 2010 por su impecable e invaluable trabajo en fecundación y desarrollo preimplantacional humano *in vitro*, comenzara a estudiar la posibilidad de maduración de ovocitos de mamífero, incluyendo humanos, en condiciones de laboratorio.

Para 1970, Edwards, Steptoe, Bavister y Purdy habían logrado la fecundación de ovocitos humanos y el desarrollo preimplantacional hasta el estado de 16 células (1969, pp. 632-635; 1970, pp. 1307-1309). Y en 1975, un primer embarazo resultado de fecundación y desarrollo preimplantacional in vitro con transferencia embrionaria, que desafortunadamente se implantó de manera ectópica en la trompa de Falopio de la paciente (Steptoe & Edwards, 1976, pp. 880-882).

Tres años después, el 25 de julio de 1978, nace Louise Brown en Oldham (Steptoe & Edwards, 1978, pp. 366) y seis meses después nace Alastair McDonald, los primeros bebés nacidos vivos en Inglaterra con fecundación in vitro y transferencia embrionaria. La descripción de los procedimientos clínicos, de fecundación y cultivo embrionario humano en un laboratorio, que condujeron a los primeros nacimientos vivos con fecundación in vitro y transferencia embrionaria en el mundo, fue publicada en 1980 por Edwards, Steptoe y Purdy (1980, pp. 737-756).

En junio del mismo año, un equipo biomédico australiano con 10 años de trabajo, dirigido por Carl Wood y Alan Trounson en Melbourne, reporta el nacimiento de Candice Reed, la tercera bebé nacida viva con fecundación in vitro y transferencia embrionaria. En Estados Unidos, Howard Jones Jr. y Georgina Seegar Jones dirigen el equipo que consigue el nacimiento de Elizabeth Jordan Carr en diciembre de 1981, y en Francia, nacen Amandine en febrero y Alexia en junio de 1982, resultado de los esfuerzos del grupo formado por Jean Cohen, Emile Papiernik y René Frydman; apoyados por el Profesor Jacques Testart y las biólogas Jaqueline Mandelboun y Michelle Plachot (Cohen, Trounson, Dawson, Jones, Hazekamp, Nygren & Hamberger, 2005, pp. 1-21).

En los años siguientes comenzó el desarrollo de la plataforma asistencial que sería reconocida como Reproducción Humana Asistida (RHA). En 1983, el laboratorio australiano dirigido por Alan Trounson reporta sus primeros embarazos con un embrión humano de 8 células (día 3) criopreservado y descongelado (Trounson & Mohr, 1983, pp. 707-709) y con un embrión fecundado in vitro, donado a otra paciente (Trounson, Leeton, Besanko, Wood & Conti, 1983, pp. 835-838). Y en 1984 Ricardo Asch y su equipo logran un embarazo transfiriendo espermatozoides y ovocitos separados por una burbuja de aire en la trompa de Falopio de una paciente mediante una laparoscopia (Asch, Ellsworth, Balmaceda & Wong, 1984, p. 1034). Este procedimiento fue conocido como GIFT por la sigla en inglés de Gamete Intra Falopian Transfer, y la separación de los gametos por una burbuja de aire en el catéter, no tenía ninguna razón técnica; respondía únicamente al pensamiento ortodoxo de que los gametos debían juntarse y fecundar en el interior del cuerpo femenino.

En América Latina, Elkin Lucena Quevedo, director del Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES) en Bogotá, comunica

en 1984 el logro de su primer embarazo con fecundación in vitro, criopreservación, descongelación y transferencia embrionaria (Lucena, 1984). A su vez, el mismo año, un nuevo reporte corresponde a Alberto Costoya y su equipo en el Hospital Militar de Santiago de Chile (Costoya, Schmitt, Rey, Dujovne, Sánchez, Gadan, Pastore, Roblero, Aguilar & Caballero, 1984, pp. 206-216). Al nacer en 1985, la bebé colombiana recibe el nombre de Diana Carolina y el chileno se llama Aliro.

En 1987, Roberto Nicholson del Centro de estudios en ginecología y reproducción (CEGYR), en Buenos Aires, Argentina, reporta en una carta al editor de *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* el primer nacimiento de un bebé argentino con fecundación in vitro y transferencia de embriones (1987, pp. 2). Asimismo, el equipo biomédico argentino también estuvo integrado por Nicolás Neuspiller, Juan C. Mannara, Santiago Brugo y Roberto Coco.

LA TECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA EN EL PERÚ

En el Perú, las primeras pruebas de desarrollo preimplantacional, que consistían en la capacitación espermática y fecundación in vitro en roedores de laboratorio, se realizaron entre 1978 y 1984 en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. A su vez, los estudios de desarrollo embrionario preimplantacional in vitro se efectuaron en el laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo a cargo de Víctor Ishiyama Cervantes. Asimismo, los de capacitación espermática y fecundación in vitro, en el laboratorio de Biología Celular dirigido por Hugo Gonzales Figueroa.

En 1984, las pruebas de capacitación espermática con espermatozoides de roedor que se realizaban en la UNMSM se modificaron de acuerdo a los requerimientos necesarios para hacerlas con espermatozoides humanos, y en el mismo laboratorio de Biología Celular se implementaron ensayos de fecundación heteroespecífica y el test hipoosmótico para evaluar la capacidad fértil del espermatozoide humano, según las pruebas funcionales vigentes en la década de 1980. El mismo laboratorio sanmarquino, se encargó de modernizar los espermogramas convencionales vigentes en el Perú desde la década de 1950, de acuerdo a las nuevas normas propuestas por la Organización mundial de la salud (OMS) en la primera edición del Manual de la OMS para el examen de semen humano y las interacciones entre los espermatozoides y el moco cervical (World Health Organization, 1980).

Durante el año 1985, se fue formando un primer equipo biomédico que realizó procedimientos de transferencia de gametos a la trompa de Falopio (GIFT) en el área quirúrgica de la Clínica Delgado en Miraflores. En principio, el grupo estuvo integrado por Juan Coyotupa Vega, a cargo de la selección de pacientes y de la estimulación folicular, Eduardo Maradiegue

Méndez, quien aspiraba los folículos y transfería los gametos mediante un procedimiento de cirugía laparoscópica; junto con Guillermo Llerena Cano, quien hacía las capacitaciones espermáticas, identificaba los ovocitos en el líquido folicular aspirado y cargaba el catéter laparoscópico con los gametos para la transferencia. Poco tiempo después se incorporó Luis Noriega Hoces, implementando por primera vez en el Perú la aspiración de folículos ováricos mediante punción transvaginal guiada por ultrasonido.

En 1989 se toma la decisión de abordar la nueva tecnología de Reproducción Humana Asistida por fecundación *in vitro* y transferencia de embriones. Para esto, Ladislao Prazak Krofta, Luis Noriega Hoces y Guillermo Llerena Cano, organizan un grupo de trabajo, asesorados por Nicolas Neuspiller, Juan C. Mannara y Roberto Coco del Instituto FECUNDITAS en Buenos Aires.

Durante varios meses, todo el trabajo giró alrededor de la implementación de un laboratorio especialmente diseñado para procedimientos de cultivo de gametos y embriones humanos. Esto incluyó la elección de un ambiente aislado, pero comunicado con una sala de operaciones, así como la adquisición de microscopios, incubadoras y otros equipos y materiales de laboratorio; además de la instalación de las medidas de bioseguridad requeridas en la época.

Los primeros veinte procedimientos peruanos de Reproducción Humana Asistida, con selección de pacientes, estimulación y sincronización folicular con gonadotropinas, aspiración folicular guiada por ultrasonido, fecundación *in vitro*, desarrollo embrionario preimplantacional hasta el tercer día (8 células) y transferencia de embriones, se realizaron en la Clínica Santa Isabel entre la última semana de noviembre y la primera de diciembre del año 1989 (Prazak, Noriega & Llerena, 1990).

En agosto de 1990, nace Victoria, la primera bebé peruana fecundada con un procedimiento *in vitro* y de transferencia embrionaria. El mismo año, durante las actividades del X Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología, se informa sobre el reciente nacimiento en una presentación formal, y el Comité de premios y distinciones de la Sociedad decide otorgar el Premio “Prof. Dr. Eduardo Valdivia Ponce” a Ladislao Prazak K., Luis Noriega H. y Guillermo Llerena C. por los primeros tratamientos de Reproducción Humana Asistida con procedimientos de alta complejidad (Vidal, Amat y León, 1991, pp. 231).

Entre 1991 y 1992, el Grupo PRANOR trabajando en la Clínica Montesur, implementa el primer banco de semen humano y progresa en la optimización de su Programa de RHA. En el mundo, se reportan los primeros resultados de embarazos logrados inyectando espermatozoides con pobre motilidad, en el citoplasma de ovocitos maduros (Palermo, Joris, Devroey & Steirteghem, 1992, pp. 17-8). La nueva técnica es reconocida

como Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) y en poco tiempo se convierte en la mejor opción de fecundación in vitro con espermatozoides vivos sin la motilidad suficiente para atravesar las cubiertas y envolturas del ovocito.

En 1993, el laboratorio de RHA de PRANOR se traslada al Instituto de Ginecología y Reproducción en Monterrico y se realizan en el Perú los primeros procedimientos de criopreservación de embriones utilizando un programa de descenso de temperatura secuencial. En Estados Unidos, entre 1994 y 1995, Santiago Munne y su equipo realizan pruebas de diagnóstico-perfil citogenético preimplantacional (PGD-PGS), identificando anomalías cromosómicas numéricas en embriones de ocho células antes de la transferencia (Munné, Sultan, Weier, Grifo, Cohen & Rosenwaks, 1995, pp. 1191-1201).

Estas pruebas representaron el punto de partida de una serie de ensayos moleculares desarrollados para identificar la constitución cromosómica de los embriones. En principio el PGD-PGS se hacía en blastómeras de día 3 con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Más adelante se utilizan las células del trofoectodermo de blastocistos de día 5 con técnicas de hibridación genómica comparativa (CGH) o polimorfismo de nucleótido único (SNP).

La tendencia actual se orienta hacia el estudio del ADN de los 24 cromosomas que constituyen el genoma humano, con secuenciación de nueva generación (NGS).

Asimismo, desde 1996, PRANOR organiza un programa de donación de ovocitos, especialmente orientado a parejas en las que la mujer está en la etapa perimenopausica, con suspensión periódica de la menstruación, reserva ovárica comprometida o es mayor de 45 años. Desde un principio, la donación de ovocitos de mujeres jóvenes, logró excelentes resultados en términos de tasa de embarazo y “bebé en casa” (Noriega, Romero, Prazak, Vizcarra, Llerena & Benavides, 1998, pp. 8-11; Noriega, Vizcarra, Romero, Llerena & Prazak, 1998, pp. 9-15), aunque las consideraciones morales y éticas eran bastante complejas, tanto o más que las que en sus inicios abordaron la tecnología de fecundación y desarrollo embrionario preimplantacional humano in vitro.

En el año 1999, la revista *Human Reproduction* publica el reporte de un nacimiento con ovocitos donados y vitrificados, es decir, criopreservados con una técnica de congelación ultrarápida que utiliza altas concentraciones de crio-protectores. Los ovocitos desvitrificados fueron fecundados por inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) y los embriones resultantes transferidos a una paciente de 47 años. (Kuleshova, Gianaroli, Magli, Ferrareti & Trounson, 1999, 3077-3079). En los años

siguientes, la técnica de vitrificación de ovocitos, embriones en desarrollo preimplantacional y blastocistos, superó notablemente los resultados de sobrevida, fecundación, implantación, embarazo y nacidos vivos, que se habían logrado usando la técnica de descenso secuencial de temperatura, aplicada en embriones con ocho blastómeras (día 3). El mismo año en el Perú, el grupo PRANOR presenta el primer caso de embarazo con embriones criopreservados (Noriega, Prazak, Vizcarra, Díaz, Benavides, Sepúlveda, Llerena, García & Romer, 1999, pp. 12-13) y un año después Soledad Sepúlveda Jiménez asume la dirección del laboratorio de RHA.

En la figura 1 se presenta de manera esquemática un cuadro comparativo sobre los procedimientos de reproducción humana asistida que se han aplicado en el laboratorio del grupo PRANOR entre 1989 y 1998 y después entre 1999 y 2014.

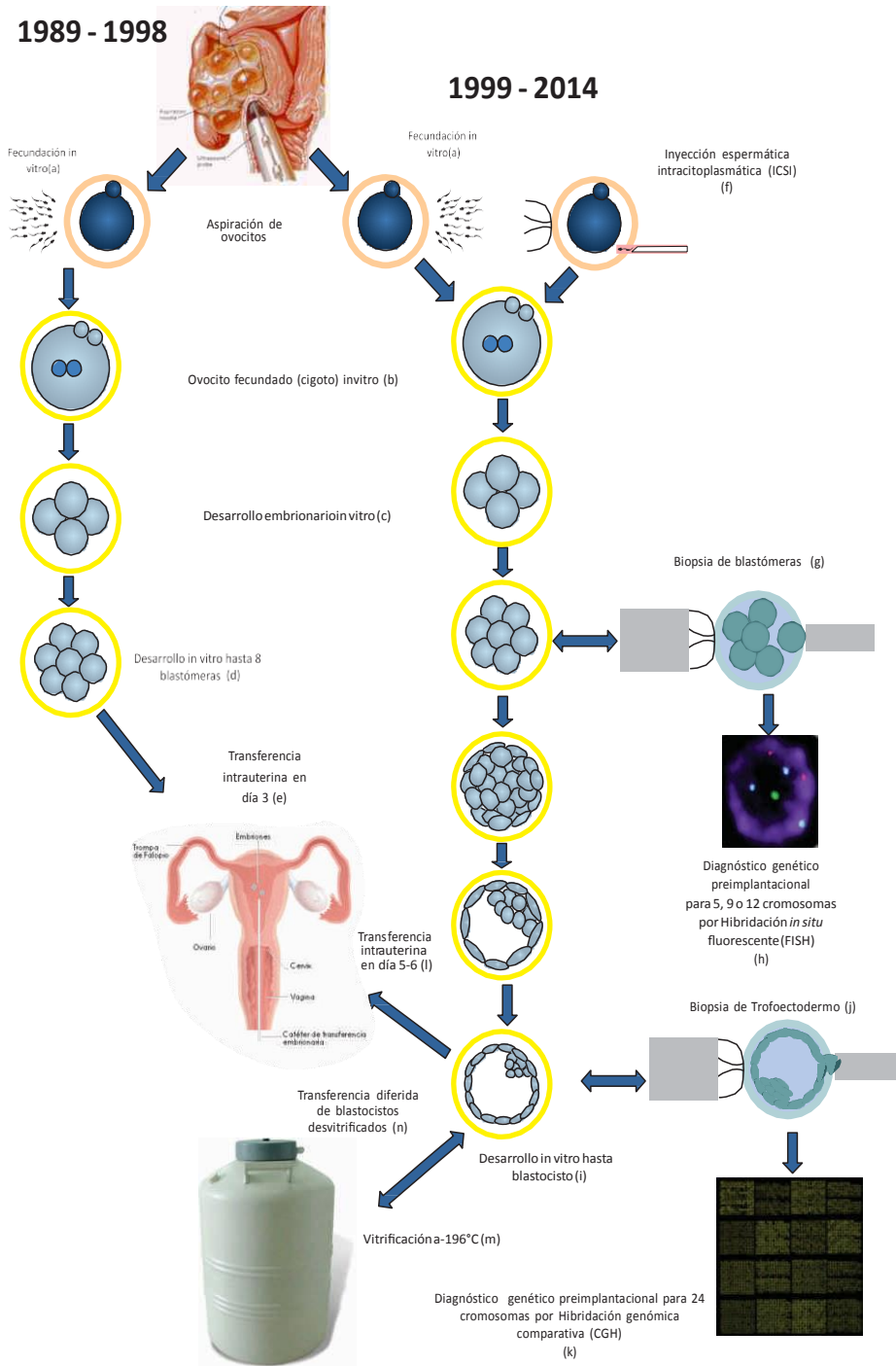
Desde su implementación en la década de 1980, todos los tratamientos de infertilidad orientados a RHA, pasan por un proceso de selección de la pareja, apoyados por exámenes clínicos, bioquímicos y biológicos, que establecen las posibles causas del problema de infertilidad. En la mujer los exámenes suelen ser más complejos, debiendo incluir evaluaciones anatómicas externas e internas que definan una situación morfo-funcional adecuada para la ovulación, el transporte de gametos, la implantación y la capacidad para llevar un embarazo a término; funciones que por lo general se ven comprometidas conforme avanza la edad cronológica. En el hombre, en la mayoría de casos, es suficiente hacer una evaluación del eyaculado en términos de concentración, motilidad y morfología de los espermatozoides. Aunque también es importante tener información sobre la calidad de la cromatina espermática mediante un test de fragmentación del ADN.

Luego de realizado el diagnóstico, el procedimiento de RHA comienza con la inducción controlada de superovulación, este periodo comprende aproximadamente 10 días y requiere que la paciente reciba medicación específica para su condición ovulatoria, dirigida a inducir el crecimiento y desarrollo de un número de folículos que produzcan los ovocitos (óvulos) necesarios para tener la mejor opción reproductiva, siempre de acuerdo a la edad. Con los folículos listos, se procede a la aspiración folicular, que se realiza en un quirófano con una dosis muy suave de anestesia.

En la gráfica mencionada es muy fácil entender lo que sucede en los laboratorios de RHA después de la recuperación de ovocitos por aspiración folicular, y la selección de espermatozoides obtenidos por masturbación, o si fuera necesario, por alguna técnica quirúrgica.

En el Perú en 1989 y durante algunos años, los gametos humanos recuperados eran cuidadosamente aislados y preincubados bajo las más estrictas normas de cultivo de células disponibles en la época. Estas pocas

Figura 1. Esquema comparativo de los dos periodos de la tecnología de RHA en el Perú: 1989 a 1998 y 1999 a 2014.



horas de preincubación eran necesarias para que las células gaméticas se adapten a las condiciones de laboratorio, habiendo sido retiradas de su ambiente natural.

Si bien en todo momento los laboratorios de RHA se preocuparon por tener un control muy preciso de las variables físicas y químicas de su entorno, no había forma de establecer que estas fueran idénticas a las de sus respectivos organismos. Pero sí era posible, minimizar las posibles diferencias en términos de pH, presión osmótica, temperatura, composición química, longitud de onda de la iluminación, y otras; entre el ambiente natural y la plataforma de cultivo. Por supuesto, además se tomaban medidas extremas de bioseguridad y control de partículas tóxicas de naturaleza inorgánica.

Nuevamente en la figura, pasado el periodo de preincubación, los ovocitos maduros y los espermatozoides seleccionados se incubaban juntos durante 14 o 16 horas (a), tiempo necesario para que se produzca la fecundación y termine su proceso con la formación de los pronúcleos (b). Dos días después, los embriones normales alcanzaban un desarrollo de cuatro blastómeras (c) y a las 72 horas se podía observar entre seis y ocho blastómeras (d) dentro de la zona pelúcida del ovocito, que se mantiene intacta.

Durante aquellos años, los métodos de cultivo de embriones humanos más allá del tercer día aún no habían sido satisfactoriamente estandarizados, razón por la cual las transferencias de embriones a la cavidad uterina de la madre se hacían a las 48 o 72 horas de cultivo *in vitro* (e).

Como ya se ha mencionado, avanzada la década de 1990, en el Perú se realizan los primeros procedimientos de RHA con ovocitos donados y con embriones criopreservados. En los procedimientos de criopreservación embrionaria de la época se utilizaron métodos de descenso térmico secuencial, monitoreados por un *software*, hasta alcanzar la temperatura del nitrógeno líquido.

A finales del siglo XX, se realizan los primeros procedimientos de inyección espermática intracitoplasmática (f) identificados como ICSI por la sigla en inglés de IntraCytoplasmic Sperm Injection. Esta novedosa tecnología, que utilizaba un instrumento diseñado a principios de siglo para capturas unicelulares, estaba orientada a superar las limitaciones que pudieran tener los espermatozoides para ingresar al citoplasma del ovocito, particularmente en pacientes afectados por algún factor espermático severo. El proceso de micromanipulación, asegura la presencia del espermatozoide dentro del ovocito, el proceso de fecundación continúa de manera fisiológica a partir de ese momento, y cumple su periodo de 14 a 16 horas.

En los primeros años del siglo XXI, utilizando los mismos equipos de micromanipulación con los que se hacían los ICSI, era posible remover, o hacer una biopsia, de una o dos blastómeras en un embrión de 72 horas (g) para diagnóstico genético preimplantacional. Para esto se identificaba la presencia de 5, 9 o 12 cromosomas utilizando la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente, reconocida como FISH por la sigla en inglés de Fluorescent In Situ Hybridization.

El diagnóstico genético preimplantacional por FISH (h) identifica la constitución cromosómica normal o alterada de la blastómera examinada, para los cromosomas que tienen mayor frecuencia de desarreglos numéricos, en los abortos espontáneos de primer trimestre y en los neonatos afectados por una cromosomopatía.

Otra importante contribución para el cultivo de embriones humanos *in vitro* fue el desarrollo de medios de cultivo extendido a día 5 o 6, con un embrión en estado de blastocisto (i) que ya tenía dos tipos celulares muy diferenciados, identificables morfológicamente y en el espacio. Este cultivo más prolongado fue determinante como un mecanismo de autoselección embrionaria y además para poder identificar un grupo celular periférico que no estaba destinado a formar estructuras embrionarias.

Las células periféricas o células del trofoectodermo (McArthur, Leigh, Marshall, De Boer & Jansen, 2005, pp. 1628–1636) tienen como destino la formación de las cubiertas o envolturas embrionarias y parte de la placenta, situación que hacía posible tomar biopsias de un mayor número de células de este tejido (j), para un diagnóstico genético preimplantacional de mayor precisión.

La tecnología para diagnóstico genético también había desarrollado, y ya era posible identificar la presencia y constitución estructural de los 24 tipos de cromosomas que constituyen el genoma humano, mediante hibridación genómica comparativa (k). Esta técnica, identificada como CGH por la sigla en inglés de Comparative Genomic Hybridization (Wells, Escudero, Levy, Hirschhorn, Delhanty & Munné, 2002, pp. 543–549), proveía una contundente herramienta para el estudio cromosómico sobre una matriz genómica.

En este periodo comenzaron las transferencias embrionarias de blastocistos en día 5-6 (l) con la tendencia a la transferencia de un blastocisto único (Gardner, Surrey, Minjarez, Leitz, Stevens & Schoolcraft, 2004, pp. 551-555) para minimizar la posibilidad de un embarazo múltiple. Incluso, el notable progreso alcanzado en criopreservación embrionaria, utilizando la técnica de vitrificación de blastocistos (m), con muy altas tasas de sobrevida, implantación y nacidos vivos; derivó en el desarrollo de procedimientos con transferencia diferida (n), esto es, en un ciclo distinto al ciclo en el que se recuperaron los ovocitos y se produjo la fecundación y el desarrollo embrionario preimplantacional en el laboratorio.

La transferencia en ciclos diferidos, de blastocistos con diagnóstico cromosómico por CGH, vitrificados y desvitrificados, demostró un significativo incremento en las tasas de implantación y embarazo a término.

La técnica de vitrificación aplicada en ovocitos (Kuwayama, Vajta, Kato & Leibo, 2005, pp. 300-308) consiguió tasas de éxito equivalentes a las que tenía con embriones preimplantacionales. Con esta opción tan segura se han establecido programas de preservación de la fertilidad en pacientes que tienen que ser sometidas a tratamientos de quimio o radioterapia, y en general para toda mujer joven que por diversas razones esté interesada en criopreservar sus ovocitos para su propio futuro reproductivo.

De manera equivalente y desde hace muchos años, la criopreservación de espermatozoides es una técnica tan exitosa que se utiliza como un procedimiento de rutina con pacientes oncológicos, con voluntarios para vasectomía, y en RHA.

En los siguientes años, se produce un notable incremento de publicaciones científicas en revistas nacionales e internacionales, reportando los progresos peruanos en RHA. Por citar algunos, en 2006, Luis Noriega y miembros del Grupo PRANOR comunican un embarazo con ovocitos descongelados e inyectados, demostrando que la criopreservación de ovocitos es una buena alternativa para pacientes que tienen riesgo de perder su función ovárica y para poder sincronizar ciclos en los programas de ovodonación (Noriega, Prazak, García & Sepúlveda, 2006, pp. 49-50).

Más adelante, Soledad Sepúlveda dirige un equipo de PRANOR que comprueba que un único medio de cultivo es tan bueno o mejor que un sistema de medios secuenciales para el cultivo de embriones humanos a partir de cigoto a blastocisto (Sepúlveda, García, Arriaga, Díaz, Noriega-Portella & Noriega-Hoces, 2009, pp. 1765-1770) y en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Guzmán, López, Vásquez, Pérez, Pino & Llerena consiguen importantes resultados en colonización intraluminal de los túbulos seminíferos en ratones, mediante trasplante heterólogo de células germinales masculinas. Los investigadores reúnen evidencia suficiente para ratificar que las células germinales primordiales de un ratón no afectado, tienen la capacidad de colonizar la membrana basal de los túbulos seminíferos de otro ratón receptor (2010, pp. 267-269).

El mismo año se publican los resultados de las investigaciones del Grupo PRANOR sobre la acción del extracto de maca en la motilidad de los espermatozoides humanos y discuten que a pesar de que los mecanismos de acción de los extractos de maca no están claramente definidos, estos se orientan hacia un modelo de acción pleiotrópica, asociado a los múltiples efectos fisiológicos del óxido nítrico (Llerena, Noriega, Portella, Mena, Lazo, Fajardo & Arce, 2010, pp. 28-32).

Para concretar toda la experiencia ganada en más de 20 años de actividad asistencial y científica del equipo PRANOR, aunada al aporte de muchos científicos peruanos y extranjeros, converge en la publicación de una primera edición de mayores magnitudes. El 2013, Noriega-Hoces, Llerena-Cano & Prazak-Krofta terminan la edición de un *Tratado de Reproducción Humana Asistida*, libro con 49 capítulos, que en 608 páginas consigue revisar el estado actual del conocimiento en la especialidad (2013, p. 608).

Este libro, editado en el Perú y publicado en español, representa el icono de muchos años de actividad asistencial, científica y académica de un grupo de médicos, biólogos, obstetras, psicólogas, abogados, enfermeras y técnicas de enfermería. Peruanos dedicados íntegramente al desarrollo de la tecnología de Reproducción Humana Asistida en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asch, R., Ellsworth, L., Balmaceda, J. & Wong, P. (1984). Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet*, 2.

Cohen, J., Trounson, A., Dawson, K., Jones, H., Hazekamp, J., Nygren, K. & Hamberger, L. (2005). The early days of IVF outside the UK. *Human Reproduction Update*, 1-21.

Costoya, A., Schmitt, J., Rey, M., Dujovne, S., Sanchez, M., Gadan, A., Pastore, U., Roblero, L., Aguilar, P. & Caballero, G. (1984). Embarazo obtenido por fertilización “in vitro” y transferencia embrionaria. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecológica*, 49(3), 206-216.

Edwards, R., Bavister, B. & Steptoe, P. (1969) Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 221, 632-635.

Edwards, R., Steptoe, P. & Purdy, J. (1970). Fertilization and cleavage in vitro of preovulatory human oocytes. *Nature*, 227, 1307-1309.

Edwards, R., Steptoe, P. & Purdy, J. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 87, 737-756.

Gardner, D., Surrey, E., Minjarez, D., Leitz, A., Stevens, J. & Schoolcraft, W. (2004). Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*, 81, 551-555.

Guzmán, L., López, R., Vásquez, F., Pérez, S., Pino, J. & Llerena, G. (2010). Intraluminal colonization into the seminiferous tubules in mice. *Revista Peruana de Biología*, 17(2), 267-269.

Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A. & Trounson, A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction*, 14, 3077-3079.

Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O. & Leibo, S. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. BioMed. Online*, 11 (3), 300-308.

Lucena, E. (1984). Comunicación personal. Centro colombiano de fertilidad y esterilidad, CECOLFES, Colombia.

Llerena, G., Noriega, L., Portella, J., Mena, R., Lazo, M., Fajardo, K. & Arce, M. (2010). Los extractos de maca negra, podrían tener acción directa sobre la cantidad de espermatozoides con motilidad progresiva en el eyaculado. *Infertilidad y Reproduccion Asistida*, 2 (1), 28- 32.

McArthur, S., Leigh, D., Marshall, J., De Boer, K. & Jansen, R. (2005). Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril*, 84, 1628–1636.

Munné, S., Sultan, K., Weier, H., Grifo, J., Cohen, J. & Rosenwaks, Z. (1995). Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18 and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *American Journal Obstetrics and Gynecology*, 172, 1191-1201.

Nicholson R. (1987). In vitro fertilization and embryo transfer at the CEGYR, Buenos Aires, Argentina. *Letters to the editors. Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*, 4(2).

Noriega, L., Llerena, G. & Prazak, L. (2013) *Tratado de Reproducción Humana Asistida*. Lima – Perú. REPSAC & Grupo PRANOR, 608.

Noriega, L., Prazak, L., Vizcarra, F., Díaz, J., Benavides, D., Sepúlveda, S., Llerena, G., García, J. & Romero, R. (1999). Primer caso con embriones criopreservados en el Perú. *Reproducción Humana*, 2, 12-13.

Noriega, L., Prazak, L., García, J. & Sepúlveda, S. (2006). Embarazo luego de la transferencia de embriones obtenidos por microinyección (ICSI) de ovocitos descongelados. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 52 (1), 49-50.

Noriega, L., Romero, R., Prazak, L., Vizcarra, F., Llerena, G. & Benavides, D. (1998). Ovodonación en el Perú. *Reproducción Humana*, 1, 8-11.

Noriega, L., Vizcarra, F., Romero, R., Llerena, G. & Prazak, L. (1998). Ovodonación en el Perú: dos años de experiencia. *Primeros resultados de*

fertilización in vitro - transferencia embrionaria con ovocitos donados. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 44 (1), 9-15.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. & Van Steirteghem, A. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-8.

Prazak, L., Noriega, L. & Llerena, G. (1990). Fertilización asistida con procedimientos de alta complejidad. X Congreso Peruano de Obstetricia y Ginecología.; Lima - Perú.

Sepúlveda, S., García, J., Arriaga, E., Díaz, J., Noriega, L.G. & Noriega, L. (2009). In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fert Steril*, 91 (5), 1765-1770.

Step toe, P. & Edwards, R. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2, 366.

Step toe, P. & Edwards, R. (1976). Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet*, 1, 880-2.

Trounson, A. & Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature*, 305.

Trounson, A., Leeton, J., Besanko, M., Wood, C., & Conti, A. (1983). Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilized in vitro. *British Medical Journal*.

Vidal, J. (1991). Discurso Memoria. *Revista de Ginecología y Obstetricia*, 37(11).

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 1st edn. 1980. Press Concern, Singapore.

Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J., Munné, S. (2002). First clinical application of comparative genomic hybridization (CGH) and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of aneuploidy. *Fertil Steril*, 78.