

REVISTA

# ASEBIR

Junio 2013 Vol. 18 N° 1

20-22  
NOVIEMBRE



## VII CONGRESO

SEVILLA 2013 CENTRO DE CONVENCIONES GRAN SEVILLA

**EDITORIAL** El futuro es nuestro / **ACTUALIDAD** En un lugar de Extremadura... / Transferencia de huso meiótico para la prevención de enfermedades mitocondriales: más cerca la aplicación clínica / **VII CONGRESO ASEBIR** / **AULA JOVEN** Análisis del estrés oxidativo en el eyaculado mediante la determinación del anión superóxido / **AULA JOVEN** Fragmentación del ADN espermático, ¿Es útil su estudio? / **DEBATE** ¿Por qué los socios de ASEBIR participan tan poco en los temas de debate de nuestra revista? (Parte II) / **FORMACIÓN CONTINUADA** Gastrulación: proceso clave en la formación de un nuevo organismo / **AGENDA** / **NOTICIAS**

## CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

*Parámetros sometidos a examen:* Casos virtuales de pacientes con embriones  
D+2 a D+5 en los que se evaluará:

- Características morfológicas
- Clasificación y decisión clínica

*Comprobación de toxicidad de material.*

*Características específicas:* Duración: 1 año.

*Nº Especímenes:* vídeo y material esterilizado.

*Envío de muestra:* Uno.

*Envío documentación:* Uno.

*Envío de datos:* Vía página web.

*Informes:* Valoración por consenso de laboratorios

*Valoración por consenso de grupo de expertos*

*Proceso de datos:* Informatizado.

**PLAZO MÁXIMO DE INSCRIPCIÓN  
30 DE SEPTIEMBRE DE 2013**

<http://controldecalidad.asebir.com/>

*Con la colaboración de:*

**Ceifer**

### SUMARIO

### Pág.

<b>EDITORIAL</b>	<b>2</b>
El futuro es nuestro Manuel Ardoy	
<b>ACTUALIDAD</b>	<b>3</b>
En un lugar de Extremadura... José Mijares Gordún	
Transferencia de huso meiótico para la prevención de enfermedades mitocondriales: más cerca la aplicación clínica Nuno Costa-Borges, Xavier Santamaría, Gloria Calderón	<b>6</b>
<b>VII CONGRESO ASEBIR</b>	<b>11</b>
<b>AULA JOVEN</b>	<b>15</b>
Análisis del estrés oxidativo en el eyaculado mediante la determinación del anión superóxido Araceli Nicolich, Rafael Lafuente, Gemma López, Agustín García-Peiró, Mario Brassesco	
<b>AULA JOVEN</b>	<b>22</b>
Fragmentación del ADN espermático, ¿Es útil su estudio? María Estomba, Yosú Franco, M <sup>a</sup> José Lázaro	
<b>DEBATE</b>	<b>27</b>
¿Por qué los socios de ASEBIR participan tan poco en los temas de debate de nuestra revista? (Parte II) Jorge Cuadros y Marga Esbert	
<b>FORMACIÓN CONTINUADA</b>	<b>29</b>
Gastrulación: proceso clave en la formación de un nuevo organismo Carmen López-Sánchez, Virginio García-López, José Mijares, José Antonio Domínguez, Francisco M. Sánchez-Margallo, Ignacio Santiago Álvarez-Miguel, Virginio García-Martínez	
<b>AGENDA</b>	<b>42</b>
<b>NOTICIAS</b>	<b>44</b>
<b>INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES</b>	<b>46</b>

Junio 2013 Vol. 18 N°1

### EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

### EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dr. Jorge Cuadros Fernández  
CLÍNICA FIVMADRID, Madrid

### COMITÉ EDITORIAL

#### Presidente:

Dr. Manuel Ardoy Vilches  
HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

#### Vicepresidenta Responsable Certificación ASEBIR y Delegados Autonómicos:

Dra. Carmen Ochoa Marieta  
CER. CLINICA COTERO - Santander

#### Secretaría, Publicaciones:

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

#### Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero  
INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

#### Vocalía de Grupos de Interés, Investigación y Certificación ASEBIR:

Dr. Josep Santaló Pedro  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

#### Vocalía de Congresos y Certificación ASEBIR:

Dra. Yolanda Mínguez Royo  
IVI MADRID - Madrid

#### Vocalía de Docencia y Formación Continuada:

Dra. M<sup>a</sup> José Torello Ybañez  
HOSPITAL QUIRÓN, Barcelona  
Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel  
INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA -IERA -Badajoz

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA, Alicante

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

#### Vocalía Página Web:

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

#### Vocalía de Publicaciones:

Dr. Jorge Martín Cuadros Fernández  
CLÍNICA FIV-MADRID, Madrid

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS, Barcelona

Dr. Josu Franco Iriarte  
CENTRO SANITARIO VIRGEN DEL PILAR, San Sebastian

La Revista de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) está indexada en las bases de datos ICYT, de ciencia y tecnología, e IME, de Biomedicina, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España y en las bases de datos LATINDEX, para Iberoamérica y CUIDEN®, de la Fundación Index.

### PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR  
C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º, 6º / 28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94  
www.asebir.com - asebir@asebir.com

### DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

GÓBALO: Gráfica · Web · Multimedia · Consultoría  
C/ Castillo de Fuensaldaña 4, Oficina 213 | 28232 · Las Rozas · Madrid  
Tfno - Fax.: 91 626 39 74 | www.gobalo.es · info@gobalo.es  
Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424 | Soporte válido: 78-R-CM

Manuel Ardoy, el futuro es nuestro

2

## EL FUTURO ES NUESTRO

Estimados amigos,

Me han pedido desde la Vocalía de Publicaciones que escriba este último editorial de nuestra revista, correspondiente a la actual Junta Directiva. Podría haber hecho un repaso de nuestra actividad durante estos casi 4 años, pero aún nos quedan unos meses y, además, de aquello que no hayamos realizado, de lo que sí hemos hecho, y de si está bien o mal y de sus consecuencias, prefiero dar cuentas cara a cara en la Asamblea General en el próximo Congreso de Sevilla, en noviembre.

Ahora prefiero mirar al futuro...

En su momento, Antonio González Utor, cuando comencé en su Junta Directiva hace ya muchos años, me dijo algo con razón:

“¡Manolo!, la muerte más probable de una Sociedad Científica está en su inviabilidad económica”.

A este mensaje yo quiero añadir uno complementario.

Y su vitalidad depende del trabajo de sus socios.

Lo que hayamos trabajado en ASEBIR durante estos casi diez años, lo que dentro de poco pertenecerá al pasado, no es lo que más me emociona. Lo que más me importa es lo que vendrá en el futuro.

El reto no lo tiene sólo la próxima Junta Directiva. EL VERDADERO RETO DEL FUTURO LO TIENEN TODOS LOS MIEMBROS DE ASEBIR. Porque ASEBIR y todo lo que ella implica, depende de manera casi exclusiva de lo que queráis trabajar y crecer con ella.

Os invito a implicaros aún más en algo que es vuestro.

*Manuel Ardoy*

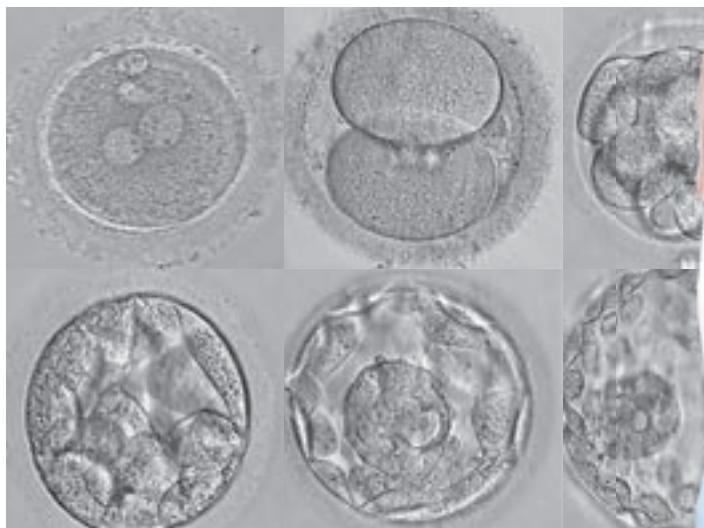
*Dentro de 5 meses expresidente de ASEBIR*

## Continuous Single Culture™ Media

Desde la fertilización hasta el día 5/6 de desarrollo

Sin cambios,  
sin stress

CE  
0050



DISTRIBUIDO POR:



IZASA



IrvineScientific®

[www.izasa.es](http://www.izasa.es)

Atención al Cliente: 902 20 30 90



## EN UN LUGAR DE EXTREMADURA...

José Mijares Gordún

Coordinador Aula EMB-ASEBIR Responsable Área Reproducción Asistida, CCMIJU

Parece mentira, ha pasado un año desde que iniciásemos nuestra andadura y podríamos decir, ahora que están tan de moda las series de televisión, que ha finalizado la primera temporada del Aula EMB-ASEBIR. Para los que se pregunten a qué me refiero, hablo del área de reproducción asistida que se encuentra en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, situado en la entrada de Cáceres por la carretera de Madrid.

seguridad en uno mismo, habilidad y técnicas que tanto requerimos y que necesitamos practicar continuamente. Y así fue, gracias a la ayuda de EMB pudimos ponernos en contacto con las principales casas comerciales y parece que la idea les entusiasmó. Lo que luego aconteció os lo podéis imaginar, miles de reuniones del tridente CCMIJU-EMB-ASEBIR, que permitieron alcanzar un feliz acuerdo, como ya sabéis.

vitrificación y banco de semen; de los cuales ya están en marcha las segundas ediciones. Se puede decir que de momento hemos completado nuestra función, al final de esta anualidad habrán pasado ya cerca de los 100 alumnos, de los cuales tengo la certeza de que el grado de satisfacción ha sido alto; los que habéis estado, así lo afirmáis en las encuestas que os hago rellenar. Así que si las instalaciones son una maravilla (residencia, animalario, salas teóricas,



*I Practicum de Vitrificación*

Hubo un día en el que pensamos que, de igual manera que por el centro pasan miles de médicos, enfermeros, veterinarios, etc., los profesionales de nuestra especialidad, y digo especialidad porque ya va siendo hora de que lo sea (ánimo Carmen), debíamos tener un sitio donde poder dar las pinceladas de conocimiento, manejo,

Esta unidad está concebida como un lugar donde los embriólogos puedan formarse, tanto los que desean poder llegar a serlo algún día, como los que necesitan perfeccionarse en las técnicas y conocimientos de nuestra especialidad. Para ello, hemos ofertado cuatro Cursos, o mejor dicho cuatro Prácticos: embriología, ICSI,

laboratorios y quirófanos de ensueño), si los equipos son de última generación (ICSI, IMSI, Laser, incubadoras tri-gas u Oosight entre otros...) y los profesionales son lo mejor que tenemos en el país (la mayoría de vosotros me estáis leyendo), nuestro desarrollo embrionario es de buen pronóstico. En cualquier caso, creo que todavía



*I Curso de Congelación y Gestión de Banco de Semen*

se puede mejorar, que le podemos dar otro impulso a la reproducción asistida. Tenemos las puertas abiertas a todo aquel que, con lo que antes os he comentado, quiera investigar, mejorar o desarrollar aquello que siempre deseó y nunca supo cómo o dónde realizarlo. En definitiva, queremos que esta unidad sea un lugar donde intentemos que todo lo que se os pueda llegar a ocurrir, podáis llevarlo a cabo.

Finalmente, me gustaría hablar de mi experiencia personal. He podido llegar a conocer, fuera de sus quehaceres diarios, a grandísimos profesionales, de los cuales hoy puedo decir son mis amigos y a los que estoy deseando volver a ver; todos esos José Luises y Cármenes, Santis, Juanis, Martas, Nieves, Jorges, M<sup>a</sup> Josés, Miqueles, Albertos, Cristinas, son los que han dejado en muchas ocasiones sus propios obligaciones para venir a compartir su "masa celular interna", para que de una manera u otra implante en todos nosotros, los alumnos y los que sin serlo pretendemos aprender de vosotros. Y por último, tengo que agradecer a todos los centros los cuales "nos prestan" a estos maestros que nos enseñan las maravillas que pueden llegar a realizar. Somos un

aula sin vinculación ni obligación de ningún tipo hacia cualquier centro, y de esta manera debemos seguir, pero siempre agradecidos a los IVI, DEXEUS, QUIRÓN, NORBA, IERA, FIV MADRID y muchos más que venís de camino... MÁS VIDA, VISTA HERMOSA, LABCLINIC, INST. MARQUÉS... Como siempre os digo cuando me preguntáis qué tenéis que hacer... Nada, el trabajo es nuestro, vosotros sólo tenéis que venir a disfrutar, unos aprendiendo y otros enseñando. Os espero amigos...





 **BioCare**  
EUROPE

**KITAZATO**




  
**Rocketmedical**

**RI**

**nunc**

**Panasonic**

**IVFtech**

 **BioCare**  
EUROPE

Somebody is waiting for  
good news

BioCare Europe  
España / Francia / Grecia / Italia / Portugal / Suiza  
Tlfn: 900 99 39 36 - Fax: 954 50 07 69  
[www.biocareeurope.com](http://www.biocareeurope.com)

## TRANSFERENCIA DE HUSO MEIÓTICO PARA LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES MITOCONDRIALES: MÁS CERCA LA APLICACIÓN CLÍNICA

### *MATERNAL SPINDLE TRANSFER TO PREVENT MITOCHONDRIAL DISEASES: CLOSER TO CLINICAL APPLICATION*

Nuno Costa-Borges<sup>1</sup>, Xavier Santamaría<sup>2</sup>, Gloria Calderón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embryotools, Parc Científic de Barcelona

<sup>2</sup> IVI-Barcelona

[nuno.borges@embryotools.com](mailto:nuno.borges@embryotools.com)

#### RESUMEN

Las enfermedades causadas por mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) presentan frecuentemente patologías severas y actualmente no tienen tratamiento. Se conoce que son transmitidas por herencia materna, también denominada herencia citoplasmática. Aunque la reproducción asistida ha propuesto diferentes estrategias para intentar prevenir las, éstas no han sido lo suficientemente exitosas para la aplicación clínica. Sin embargo, la reciente publicación de una novedosa técnica de reproducción asistida, la transferencia de huso meiótico (MST) en ovocitos humanos, ha reabierto la esperanza, no sólo a la posibilidad de prevenir enfermedades mitocondriales, sino también a la resolución de problemas de infertilidad relacionados con defectos citoplasmáticos del ovocito. En este artículo, se describen las características de esta técnica y el significado de su eventual uso clínico.

**Palabras clave:** enfermedades mitocondriales, transferencia huso meiótico, ovocito, mtDNA

#### SUMMARY

Mitochondrial diseases associated to mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) are severe in most cases and currently do not have treatment. It is known that these diseases are maternally inherited through the oocyte's cytoplasm. Although assisted reproduction has proposed different strategies to prevent them, most of the techniques developed were not sufficiently successful to be used in clinical treatments. However, the recent publication of a novel assisted reproduction technique, known as meiotic spindle transfer (MST) in human oocytes, has re-opened new hopes for the prevention not only of mitochondrial diseases, but also to solve some infertility problems caused by cytoplasmic defects in the oocytes. Here, we analyze the characteristics and meaning of these new findings for future clinical applications.

**Keywords:** Mitochondrial diseases, Maternal Spindle transfer (MST), oocyte, mtDNA

Las mitocondrias son orgánulos presentes en prácticamente todas las células eucariotas, que cumplen importantes funciones en el metabolismo celular. Actúan como centrales energéticas de la célula, sintetizando ATP por vía del ciclo del ácido cítrico (de Krebs) y la cadena transportadora de electrones. Además, cuentan con su propio DNA extranuclear, conocido como DNA mitocondrial

(mtDNA), el cual se transmite por vía materna en el momento de la fecundación, cuando el embrión hereda las mitocondrias presentes en el citoplasma del ovocito.

Diferentes estudios indican que las enfermedades mitocondriales están frecuentemente asociadas a mutaciones en el DNA mitocondrial, o bien a mutaciones en genes nucleares

que codifican proteínas implicadas en el correcto funcionamiento de la mitocondria. Aunque la gravedad y sintomatología de estas enfermedades es variable, estas patologías severas afectan habitualmente a órganos o tejidos que requieren un alto aporte energético, como pueden ser cerebro, corazón, hígado, músculos esqueléticos o riñones (Gropman, 2001). Son ejemplos de enfermedades



causadas por alteraciones en el mtDNA, la oftalmoplejia externa crónica progresiva, el síndrome de *Kearns-Sayre*, el síndrome *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke (MELAS)*, el síndrome de *Pearson*, el síndrome de *Leigh*, la debilidad neurogénica con ataxia y retinitis pigmentosa, la epilepsia mioclónica con fibras rojas rotas o la neuropatía óptica hereditaria de Leber (Haas et al., 2008).

Se estima que la prevalencia de estas enfermedades es de 1 en cada 5.000 nacimientos, aunque hay estudios que indican que la frecuencia de patologías hereditarias asociadas a mutaciones en el mtDNA puede ser incluso mayor, acercándose a 1 en cada 200 nacimientos (Schaefer et al. 2008).

Actualmente, no se conocen tratamientos para este tipo de enfermedades, por lo que evitar su transmisión a la descendencia es un tema preocupante para muchas familias y para lo cual se necesitan soluciones (Roberts, 1999; Craven et al., 2011).

A nivel de la reproducción asistida, el diagnóstico genético preimplantacional (PGD) se suele considerar como opción para evitar que madres portadoras de mutaciones en el mtDNA las transmitan a sus hijos. En 2006, Steffann *et al.* describieron la aplicación del PGD para un caso de debilidad neurogénica con ataxia y retinitis pigmentosa (Steffann et al., 2006) y, posteriormente, se ha descrito también el nacimiento de un niño libre del síndrome de *Leigh* a través del PGD (Unsal et al., 2008). Sin embargo, en el caso de mujeres con altos niveles de alteraciones en el mtDNA, la donación de ovocitos representa la única alternativa que asegura tener un niño sano, con la consiguiente limitación de que la descendencia no comparta su dotación genética (Craven et al., 2011).

## TRANSFERENCIA DE HUSO MEIÓTICO EN OVOCITOS

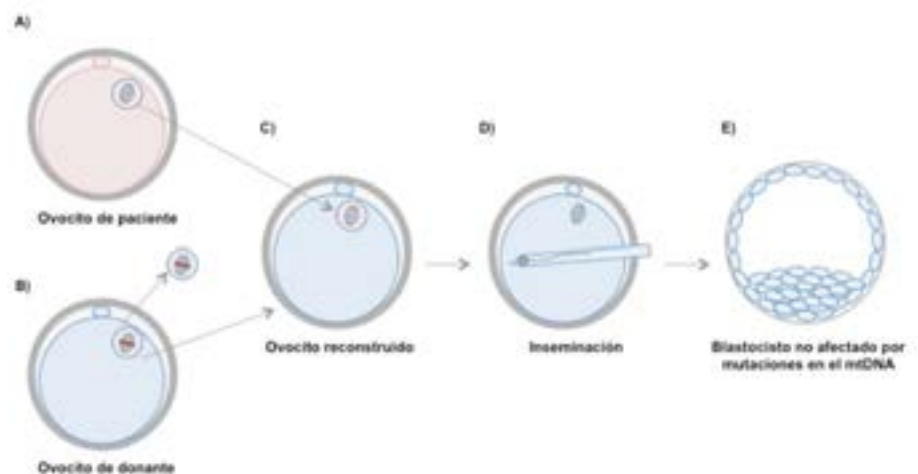
Dado que la herencia mitocondrial se transmite por vía materna, y ya que el mtDNA del futuro embrión proviene de las mitocondrias del ovocito, hace décadas que investigadores de todo mundo se esfuerzan por encontrar soluciones

viables al problema de la herencia de enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el mtDNA.

Sin embargo, ninguno de los procedimientos desarrollados hasta el momento se consideraba lo suficientemente seguro como para utilizarse como herramienta de aplicación clínica con el fin de prevenir la herencia de este tipo de enfermedades (revisado en Craven et al., 2011).

Recientemente, sin embargo, se generó la hipótesis de que si se lograra reemplazar por completo el citoplasma de un ovocito de una paciente por el citoplasma de un ovocito de donante, se podría evitar la presencia de mtDNA con alteraciones en el futuro embrión y de esta forma lograr el nacimiento de hijos libres de enfermedad. En 2009, el grupo de investigadores dirigido por Shoukhrat Mitalipov, del *Oregon National Primate Research Center*, llevó

a cabo un proyecto de investigación destinado a desarrollar la técnica denominada *Maternal Spindle transfer (MST)* o *spindle-chromosomal-complex transfer*. Esta técnica se basa en aislar y transferir el huso meiótico y los respectivos cromosomas (material genético nuclear) de un ovocito maduro, al citoplasma de otro ovocito enucleado (al cual se han extraído previamente los cromosomas). De esta manera, se logra reemplazar el citoplasma de un ovocito de una paciente con mutaciones en el mtDNA u otro tipo de defectos citoplasmáticos, por el citoplasma de un ovocito de donante, sin mutaciones en el mtDNA y con orgánulos, RNA y proteínas sanas. Con la posterior inseminación del ovocito resultante del proceso de MTS, el eventual embrión obtenido estaría genéticamente relacionado con la paciente, siendo portador de genes mitocondriales y orgánulos sanos provenientes de la donante (Fig. 1).



**Figura 1.** La técnica de transferencia de huso meiótico entre ovocitos.

A) Se aísla y aspira el complejo formado por el huso meiótico y respectiva placa metafásica (carioplasto) de un ovocito maduro afectado por mutaciones en el mtDNA u otros problemas citoplasmáticos.

B) Se transfiere el carioplasto de la paciente a un ovocito enucleado de donante (citoplasma), del cual los cromosomas han sido previamente extraídos.

C) El nuevo ovocito, constituido por el carioplasto (cromosomas nucleares) de la paciente y el citoplasma sano de la donante, queda así listo para ser fecundado.

D) El embrión obtenido estaría genéticamente relacionado con la paciente y sería portador de mtDNA y orgánulos sanos provenientes de la donante.

Los primeros ensayos realizados en el modelo primate no humano (*Reshus macaque*) demostraron la fiabilidad técnica de este procedimiento, así como su alta eficiencia, con tasas de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* similares a las obtenidas con ovocitos control (Tachibana et al., 2009). Además, los embriones transferidos a hembras receptoras, se desarrollaron normalmente y se logró el nacimiento de tres crías sanas que demostraron, mediante análisis por microsatélites, la identidad genética de las células donadoras de huso (Tachibana et al., 2009; Tachibana et al., 2010). A nivel molecular, se demostró a través de la secuenciación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) mitocondriales y polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) que el mtDNA de las crías provenía exclusivamente de los citoplastos donadores (Tachibana et al., 2009; Tachibana et al., 2010).

Transcurridos más de tres años desde el nacimiento de las tres crías, todas presentan niveles de desarrollo y crecimiento normales, y los parámetros bioquímicos de función renal, hepática y tensión arterial, así como los niveles de ATP y potenciales de membrana de las mitocondrias son similares a los encontrados en animales control de la misma edad (Tachibana et al., 2013).

Los resultados de este estudio representaron un gran hito porque, por primera vez, se demostró que es posible reemplazar por completo el mtDNA en un ovocito (todos los análisis probaron la ausencia de heteroplasmia), y por la importancia de haber sido desarrollado en un modelo animal próximo al humano.

Más recientemente, el mismo grupo, confirmó el potencial de la técnica, realizando los primeros ensayos con ovocitos humanos, cuyos resultados fueron dados a conocer el pasado mes de octubre del 2012 en la revista *Nature* (Tachibana et al., 2013).

De un total de 106 ovocitos humanos donados voluntariamente para investigación, a 65 se les practicó la técnica MST recíproca, mientras que 33

ovocitos fueron usados como control. Unavezinseminados mediante la técnica de ICSI, la tasa de fecundación de los ovocitos provenientes de MST (73%) fue similar a la obtenida con los ovocitos control (75%), aunque un porcentaje importante de cigotos (52%) presentó una tasa anormal de fecundación, determinada por un número irregular de pronúcleos (PNs) (Tachibana et al., 2013). De entre todos los cigotos que demostraron una fecundación normal, 2 PNs y 2 corpúsculos polares, las tasas de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (62%) y las tasas de derivación de células madre embrionarias (38%) fueron comparables a las obtenidas con embriones provenientes de ovocitos control. Además, todas las líneas de células madre embrionarias derivadas de blastocistos provenientes de ovocitos en los que se les practicó la técnica de MST presentaron un cariotipo normal y un contenido en mtDNA exclusivamente de origen del ovocito donante del citoplasma (Tachibana et al., 2013). Se demostró así que el mtDNA puede ser reemplazado por completo también en ovocitos humanos y que los embriones obtenidos en los que se observó una fecundación correcta son capaces de desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto y producir células madre embrionarias con una eficiencia similar a la obtenida con embriones control (Tachibana et al., 2013). Asimismo, y aunque los resultados descritos son muy prometedores, hay todavía un gran margen de investigación y un largo recorrido para mejorar las tasas de fecundación y desarrollo embrionario, y simplificar técnicamente el protocolo de MST. Además, la técnica y los resultados deben ser contrastados por otros laboratorios para que se corrobore la fiabilidad y seguridad del protocolo y así su potencial para uso clínico.

## POTENCIAL DE LA TRANSFERENCIA DE HUSO MEIÓTICO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

En el caso de que las investigaciones futuras confirmen la seguridad y fiabilidad de la técnica de MST, sus posibles aplicaciones clínicas son amplias. La aplicación más obvia es la que suscitó su desarrollo: la prevención de enfermedades mitocondriales. Como

se ha explicado anteriormente, para este fin se usaría como donador un ovocito con mitocondrias normales, lo que permitiría a una pareja afectada por una enfermedad mitocondrial tener sus propios hijos (desde una perspectiva genética) y no tener que recurrir a la donación de ovocitos con el consiguiente complemento genético diferente. Aparte de esta aplicación, la MST también puede tener indicaciones igualmente interesantes, como sería su uso en el fallo repetido de la fecundación *in vitro* o en la corrección de defectos citoplasmáticos presentes en ovocitos. También se podría aplicar a pacientes con baja reserva ovárica u ovocitos de mala calidad, lo que permitiría usar ovocitos donados pero manteniendo el DNA de la paciente. Esto último podría eliminar al mismo tiempo la retención de algunas donadoras de ovocitos que, preocupadas porque sus genes se transmitan, se replantean la donación.

## ENSAYOS CLÍNICOS

Confiando en los resultados descritos y siendo un país pionero en la investigación y desarrollo de técnicas para reproducción asistida, Reino Unido ha dado ya el primer paso en el mundo para acercar la MST, todavía en fase experimental, a la práctica clínica. La agencia británica *Human Fertilisation and Embryology Authority* (HFEA, siglas en inglés), encargada de aconsejar al gobierno sobre la regulación de esta novedosa técnica reproductiva, ha lanzado una consulta pública para saber la opinión de los ciudadanos británicos sobre posibles nuevos procedimientos médicos diseñados para evitar futuras enfermedades genéticas graves. Los resultados fueron dados a conocer en el pasado mes de marzo de 2013 y demostraron una amplia aprobación de la ciudadanía a su aplicación clínica. Dado este importante primer paso, el gobierno inglés debe decidir ahora si pretende legalizar esta práctica en humanos y buscar apoyos para que el Parlamento apruebe o no la ley en Reino Unido. Si su aplicación es exitosa en este país, se espera que se sumen a corto plazo otros países igualmente pioneros en reproducción asistida, como es España.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Craven L, Elson JL, Irving L, Tuppen HA, Lister LM, Greggains GD, Byerley S, Murdoch AP, Herbert M, Turnbull D. 2011. Mitochondrial DNA disease: new options for prevention. *Hum Mol Genet* 20: 168-174.
- Gropman AL. 2001. Diagnosis and treatment of childhood mitochondrial diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1: 185-194.
- Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Cohen BH. 2007. Mitochondrial disease: a practical approach for primary care physicians. *Pediatrics* 120, 1326-1333.
- Piña-Aguilar RE. 2011. Prevention of mitochondrial diseases: a hope through assisted reproductive technologies. *Gac Med Mex* 147:172-175.
- Roberts RM. 1999. Prevention of human mitochondrial (mtDNA) disease by nucleus transplantation into an enucleated donor oocyte. *Am J Med Genet* 87:265-266.
- Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM. 2008. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 63, 35-39.
- Steffann J, Frydman N, Gigarel N, Burlet P, Ray PF, Fanchin R, Feyereisen E, Kerbrat V, Tachdjian G, Bonnefont JP, Frydman R, Munnich A. 2006. Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet* 43:244-247.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Woodward J, Sanchis DM, Ma H, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Kang E, Lee HS, Ramsey C, Masterson K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer R, Mitalipov S. 2013. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 493:627-631.
- Tachibana M, Sparman M, Mitalipov S. 2010. Chromosome transfer in mature oocytes. *Nat Protoc* 5:1138-1147.
- Tachibana M, Sparman M, Sritanaudomchai H, Ma H, Clepper L, Woodward J, Li Y, Ramsey C, Kolotushkina O, Mitalipov S. 2009. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461:367-372.
- Unsal E, Aktaş Y, Uner O, Baltacı A, Özcan S, Turhan F, Baltacı V. 2008. Successful application of preimplantation genetic diagnosis for Leigh syndrome. *Fertil Steril* 90:2017:e11-3.



# Si quieres ahorrar dinero, esto te interesa

## Sea cual sea la fecha de vencimiento de tu póliza de hogar o auto te mejoramos el precio

Solo tienes que traernos la póliza que tengas con cualquier otra compañía antes del 30 de junio de 2013, e independientemente de su fecha de vencimiento, Segurmec te hará una oferta que te garantizará el precio más bajo con las mejores coberturas

### Seguro de automóvil



llama ahora al  
**944 354 600**  
e infórmate  
Teléfono exclusivo para  
Colegiados comercializado  
por Segurmec

Sólo con Segurmec  
**exclusivo para Asociados**  
un precio inmejorable en  
tu seguro de hogar

### Seguro de hogar



llama ahora al  
**94 435 46 00**  
e infórmate  
Teléfono exclusivo para  
Colegiados comercializado  
por Segurmec

Sólo con Segurmec  
un seguro de auto con las  
mejores condiciones  
**exclusivo para Asociados**

### iii Y recuerda!!!

Si ya tienes contratado un seguro de automóvil o un seguro de hogar con nosotros recuerda que estas ofertas son válidas tanto para ti, como Asociado como para tus familiares y allegados.

**Comparte con ellos las ventajas de poder disfrutar de unas condiciones exclusivas**

Y todo esto con nuestro compromiso de seguir ofreciéndote una atención personalizada

Nuestra labor es asesorarte a ti, Asociado y a tus familiares, en todo lo referente al sector de seguros ofreciéndote la mejor póliza para cada necesidad que te surja. Negociamos con compañías aseguradoras de total solvencia para poder ofrecerte coberturas especialmente pensadas para ti, al mejor precio y con las mejores condiciones.

### Siempre pensando en ti

Nuestro equipo de trabajo es un equipo estable formado por un grupo de personas con una larga trayectoria en Segurmec y con una gran experiencia en el sector. Nuestro trato es directo y cercano. Cada vez que te pongas en contacto con nosotros tendrás la seguridad de que nuestro compromiso es mantener contigo una atención personalizada.

**Martín Urrejola Soba** - Director  
**Pedro Gómez Fernández** - Administrativo  
**Amaia Leceta Zarate** - Administrativo  
**Marisa Marín de Vega** - Administrativo  
**Maialen Ruiz de Oña Ibañez** - Administrativo  
**Luis Mari Clemente Ormaeche** - Comercial  
**Ricardo Vallejo Martínez** - Comercial

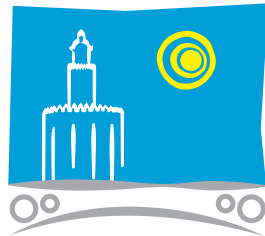
### Contacta

Por teléfono: 944354600

Por fax: 944354702

Por correo electrónico: [segurmec@colegiomedicosbizkaia.com](mailto:segurmec@colegiomedicosbizkaia.com)





## ASEBIR

### VII CONGRESO SEVILLA 2013

#### COMITÉ DE HONOR

**Excm. Sra. Doña Ana Mato Adrover**

Ministra de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

**Excmo. Sr. D. José Antonio Griñán**

Presidente de la Junta de Andalucía

**Honorable Sra. Doña María Jesús Montero Cuadrado**

Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía

**Ilmo. Sr. D. Juan Ignacio Zoido Álvarez**

Alcalde de Sevilla

**Doctor D. Antonio Ramírez de Arellano López**

Rector Magnífico de la Universidad de Sevilla

**Sr. D. Vicente C. Guzmán Fluja**

Rector Magnífico de la Universidad Pablo Olavide de Sevilla

**Sr. D. Eduardo Morán Fagúndez**

Decano del Colegio Oficial de Biólogos de Andalucía

**Dra. Dña. Anna Veiga Lluch**

Socia Fundadora de ASEBIR

Presidenta de la Asociación del año 1993 al 2003

En la actualidad Presidenta de la ESHRE

**Dr. D. Carlos Javier González-Vilardell Urbano**

Presidente del Real e Ilustre Colegio de Médicos de Sevilla

**Sr. D. Manuel Pérez Fernández**

Presidente del Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla

## COMITÉ ORGANIZADOR

### PRESIDENTE

Antonio L. González Utor

### VOCALES

Sonia Calderón Rodríguez

José Antonio Castilla Alcalá

Luisa Díaz García

Rocío Díaz Giraldez

Miguel Gañán Parra

María Hebles Duvison

M<sup>a</sup> Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta

M<sup>a</sup> Dolores Lozano Arana

Lorena Montero Venegas

Nicolás Prados Dodd

Beatriz Sánchez Andujar

M<sup>a</sup> Cristina Sánchez Pozo

M<sup>o</sup> José Torelló Ybáñez

## COMITÉ CIENTÍFICO

### PRESIDENTE

Antonio L. González Utor

### VOCALES

Ignacio Santiago Álvarez Miguel

Carmen Anarte Jimeno

M<sup>a</sup> Teresa Cañete Reina

M<sup>a</sup> José de los Santos Molina

M<sup>a</sup> José Gómez Cuesta

Lourdes López Yáñez

Laura Marqués Soler

Yolanda Mínguez Royo

José Ramón Ortiz de Galisteo Cifuentes

Agueda Ortiz Ruiz

Alberto Pacheco Castro

Lourdes Sánchez Castro

Esther Velilla García

Sandra Zamora López



SECRETARÍA TÉCNICA GRUPO PROCESS

Betaprocess, S.L.

C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª - Madrid 28037

Tel.: +34 91 377 14 23/ Fax: +34 91 377 49 65

E-mail: info@congresoasebir.es

## CRÉDITOS Y AUSPICIOS

Actividad **Acreditada** con fecha 4 de junio de 2013 por la Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación de la Consejería de Salud y Bienestar Social de Andalucía con 1.04 créditos (Actividad de Formación Continuada registrada con el número UJK0146\_00).

## CONGRESO AUSPICIADO POR



Sociedad Española de Contracepción (SEC)



Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (ASESA)



Sociedad Española de Fertilidad (S.E.F.)



Asociación Española de Biotecnología Médica (AEBM)



## CURSOS PRECONGRESO

### MIÉRCOLES, 20 DE NOVIEMBRE DE 2013

Nº 1 - Curso teórico-práctico de citometría de flujo aplicada al análisis seminal

Nº 2 - El papel del técnico en los laboratorios de reproducción asistida

Nº 3 - Curso de autores e investigadores en embriología clínica

Nº 4 - Taller interactivo de genética reproductiva

- Charla abierta del control de calidad e indicadores de ASEBIR



## PROGRAMA CIENTÍFICO PRELIMINAR

## MIÉRCOLES, 20 DE NOVIEMBRE DE 2013

15:00 - 20:00 hrs. **Apertura de secretaría**

16:00 - 17:00 hrs. **Inauguración oficial del VII Congreso Nacional ASEBIR.**

17:00 - 18:40 hrs. **Sesión de Andrología**

- Estado actual del Grupo de Interés de Andrología

*Ponente: Alberto Pacheco Castro, IVI Madrid, Madrid*

- Nuevos métodos de selección espermática (IMSI y MACS):

¿Por qué, cuándo, cómo y para quién?

*Ponente: Juan Álvarez, Androgen, La Coruña*

- Significado de las vacuolas espermáticas y su relación con las TRA

*Ponente: Giovanni Ruvolo, Centro di Biologia della Riproduzione, Palermo, Italy*

18:40 - 19:40 hrs. **Comunicaciones Orales**

20:15 hrs. **Cocktail Inaugural**

## JUEVES, 21 DE NOVIEMBRE DE 2013

08:00 - 14:00 hrs. **Apertura de secretaría**

09:00 - 10:40 hrs. **Sesión de Embriología**

- Estado actual del Grupo de Interés de Embriología

*Ponente: M<sup>a</sup> José de los Santos Molina, IVI Valencia, Valencia*

- Compatibilidad de la clasificación de ASEBIR con la clasificación de timelapse

*Ponente: Marcos Meseguer Escrivá, IVI Valencia, Valencia*

- Fallo en activación ovocitaria ¿Ovocito o espermatozoide?

*Ponente: Alan Thornhill, The London Bridge Fertility, Gynaecology and Genetics Center, London*

10:40 - 11:15 hrs. **Pausa café.**

11:15 - 12:00 hrs. **Aspectos relevantes de la salud de los Embriólogos Clínicos**

*Ponente: Pilar Jimena Moro, Centro de Salud de Alfacar, Granada*

12:00 - 13:00 hrs. **Comunicaciones Orales**

13:00 - 14:00 hrs. **Symposium Satélite 1**

14:00 - 15:30 hrs. **Comida congresual**

15:00 - 19:30 hrs. **Apertura de secretaría**

15:30 - 17:10 hrs. **Sesión de Calidad**

- Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida

*Ponente: Antonio L. González Utor, MásVida Reproducción, Sevilla*

- Conceptos de la nueva Norma Sectorial UNE 179007 para el laboratorio de FIV

*Ponente: Nereyda Ortiz Piñate, Clínica Inst. Europeo De Fertilidad, Madrid*

- Cultivo embrionario: Medios y condiciones biofísicas

*Ponente: Gloria Calderón de Oya, IVI Barcelona, Barcelona*

17:10 - 17:40 hrs. **Pausa café.**

17:40 - 18:40 hrs. **Comunicaciones Orales**

## VIERNES, 22 DE NOVIEMBRE DE 2013

---

08:00 - 14:00 hrs. **Apertura de secretaría**

09:00 - 10:40 hrs. **Sesión de Genética y Reproducción**

- **Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción**

*Ponente: Esther Vellilla García, Institut Marques, Barcelona*

- **Implicaciones éticas y legales de los tests genéticos**

*Ponente: Josep Santaló Pedro, UAB, Bellaterra, Barcelona*

- **Herramientas Bioinformáticas**

*Ponente: Ivo Gut, Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona*

10:40 - 11:15 hrs. **Pausa café**

11:15 - 12:15 hrs. **Comunicaciones Orales**

12:15 - 13:00 hrs. **Symposium Satélite 2**

13:00 - 14:30 hrs. **ASAMBLEA ASEBIR**

14:30 - 16:00 hrs. **Comida congresual**

15:00 - 19:30 hrs. **Apertura de secretaría**

16:00 - 17:00 hrs. **De la Investigación a la Aplicación Clínica....**

- **Transcriptómica de la infertilidad masculina:**

**¿Cuál es la aplicación clínica?**

*Ponente: Sandra García Herrero, Iviomics, Paterna, Valencia*

- **Metabólica y selección embrionaria ¿estamos preparados?**

*Ponente: Ana Busquets Bonet, Somdex Ginecología. Santiago Dexeus, Barcelona*

17:00 - 17:40 hrs. **Debate**

- **Qué espera un Ginecólogo de un Embriólogo Clínico?**

*Ponente: Antonio Gosálvez Vega, Hospital U. Quirón, Madrid*

- **¿Qué espera un Embriólogo Clínico de un Ginecólogo?**

*Ponente: Fernando J. Prados Mondejar, Hospital U.*

*Madrid-Montepríncipe, Madrid*

17:40 - 18:00 hrs. **Pausa café**

18:00 - 18:20 hrs. **Exposición Premios ASEBIR-EMB 2011.**

- **Reducir los Errores en FIV: Witnessing Electrónico.**

*Ponente: Xavier Orriols Brunetti, The London Bridge Fertility, London*

- **El DGP Molecular Combinado con Microarrays de CGH:**

**Una Nueva Estrategia Diagnóstica.**

*Ponente: Xavier Vendrell Montón, Sistemas Genómicos, Paterna, Valencia*

18:20 - 19:10 hrs. **Exposición Premio ASEBIR al Mejor Póster 2013**

19:10 - 19:20 hrs. **Clausura VII Congreso Nacional ASEBIR 2013**

21:30 hrs. **Cena de Clausura, anuncio y entrega de los Premios ASEBIR-EMB 2013**

# ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EYACULADO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO

## ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN EJACULATE BY DETERMINING THE SUPEROXIDE ANION

Araceli Nicolich<sup>1</sup>, Rafael Lafuente<sup>2</sup>, Gemma López<sup>2</sup>, Agustín García-Peiró<sup>3,4</sup>, Mario Brassesco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 643. Barcelona

<sup>2</sup>CIRH. Clínica Corachán. ANACER. Pza. Eguilaz, 14. Barcelona

<sup>3</sup>Centro de Infertilidad Masculina y Análisis de Barcelona (Cimab), Edificio Eureka, Parc de Recerca de la UAB, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Barcelona

<sup>4</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra

e-mail: [aracelinv@gmail.com](mailto:aracelinv@gmail.com)

Fecha recepción: 29 Marzo 2013

Fecha aceptación: 27 Abril 2013

### RESUMEN

El estrés oxidativo ejerce un papel importante sobre el daño producido en la célula espermática. Pero hay que tener en cuenta que para mantener el correcto funcionamiento del espermatozoide son necesarios niveles fisiológicos de especies reactivas de oxígeno (ROS). Es el desequilibrio entre antioxidantes y ROS el causante de alteraciones en el espermatozoide. En este estudio se hablará de la innovadora técnica del OxiSperm para medir el nivel de estrés oxidativo presente en el eyaculado del paciente. Se correlacionará los valores de estrés oxidativo con la edad del paciente y con diferentes parámetros seminales. Aunque no hemos podido observar correlación alguna con las variables estudiadas, este test puede ayudar a tomar decisiones diagnósticas y da una idea al laboratorio del modo en que se debe procesar. Un valor alto de estrés oxidativo aconsejaría un manejo rápido de la muestra, a poder ser con swim-up y evitando usar muestras congeladas para no inducir más daño. Rev Asoc Est Biol Rep 2013; 18(1):15-19.

Palabras Clave: estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno, infertilidad masculina, calidad espermática, anión superóxido.

### SUMMARY

Oxidative stress plays an important role in sperm cell damage. However, we must take into account that physiological levels of reactive oxygen species (ROS) are necessary to maintain a proper functioning of spermatozoa. Therefore, the source of sperm alterations is the unbalance between antioxidants and ROS. In this study we aim to prove the innovative technique called OxiSperm to assess the oxidative stress levels of patient's ejaculate. We correlate oxidative stress assessment with patient's age and with different seminal parameters. Although we have not been able to observe any correlation with the studied variables, this test may provide an idea on how to process the sample and may help clinicians on diagnosis. Higher oxidative stress values suggest a quickly processing of the sample, preferably using swim-up and avoiding cryopreservation in order to minimize cell damage. Rev Asoc Est Biol Rep 2013; 18(1):15-19.

Keywords: oxidative stress, reactive oxygen species, male infertility, sperm quality, superoxide anion.

### INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente el diagnóstico de la infertilidad masculina se ha basado en la observación tanto macroscópica como microscópica del eyaculado,

analizando el volumen, color, pH, licuefacción, viscosidad, concentración, motilidad o morfología. Pero estas características son insuficientes para el correcto diagnóstico de la infertilidad masculina. Estudios recientes hablan de

la asociación que hay entre la integridad u organización del DNA y la fertilidad, ya que parece evidente que interfiere en la funcionalidad del espermatozoide, además de ser necesaria para la correcta transmisión del material genético



(Atig et al., 2013). Si el material genético se encuentra dañado puede causar resultados clínicos adversos como la interrupción del desarrollo preimplantacional, incrementando la posibilidad de aborto espontáneo y morbilidad en la descendencia (Mitchell et al., 2011). Por eso cada vez más se investiga el desarrollo de diferentes técnicas diagnósticas capaces de brindar información sobre la naturaleza de la infertilidad masculina analizando otras características espermáticas.

Parece que las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la mitocondria de los espermatozoides y la estimulación de la peroxidación lipídica (LPO) son uno de los mayores causantes del daño al DNA del espermatozoide, afectando a la modificación de las bases nucleotídicas e incrementando los niveles de fragmentación del DNA (Atig et al., 2013; Venkatesh et al., 2011; Zini et al., 2011). En comparación con otras células los espermatozoides son más vulnerables al estrés oxidativo, debido a que su membrana es muy rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) (Atig et al., 2013; Cambi et al., 2013; Lewis and Simon, 2010).

Los ROS son producidos constitutivamente por el metabolismo celular. La mayor parte de ellos provienen de la reacción enzimática controlada del oxígeno con el hidrógeno en la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la mitocondria durante el metabolismo oxidativo (Tremellen, 2008). El estrés oxidativo se produce si hay un desequilibrio entre los ROS y las defensas antioxidantes del organismo (Doshi et al., 2012). Éstos son metabolitos de oxígeno entre los cuales incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales hidroxil (considerados como los más perjudiciales), y especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico ( $NO^-$ ) y el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) entre otros (Doshi et al., 2012; Zini et al., 2011).

La LPO producida por los ROS produce reacciones catalíticas autopropagables, asociadas a la pérdida de función e integración de la membrana, llevando a una clara disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide (Atig et al., 2013). La LPO en concreto afecta a la fluidez, a los gradientes iónicos, receptores de transducción

de señales, procesos de transporte y enzimas de la membrana, aspectos que interfieren tanto en la motilidad del espermatozoide como en la fusión ovocito-esperma, además de causar daño en el DNA, producido por la modificación de bases y rotura de las cadenas (Jackson et al., 2005; Kothari et al., 2010).

Los ROS pueden verse aumentados por causas medioambientales como el tabaquismo, exposición a radiación, agentes alquilantes, alcoholismo, drogadicción, calor, etc. Pero también pueden incrementarse por causas clínicas como la torsión testicular, infecciones genitales, varicocele, diabetes u obesidad (Figura 1). Un factor relevante en la síntesis de ROS es la edad masculina, ya que cada vez existe una mayor tendencia en posponer la paternidad (Pérez, 2007; Robinson et al., 2012; Zini, 2009; Zini et al., 2011).

Dado que los ROS pueden afectar la calidad espermática y el resultado de las técnicas de Reproducción Asistida, se han desarrollado recientemente métodos para detectar el nivel de estrés oxidativo en el eyaculado. Este estudio

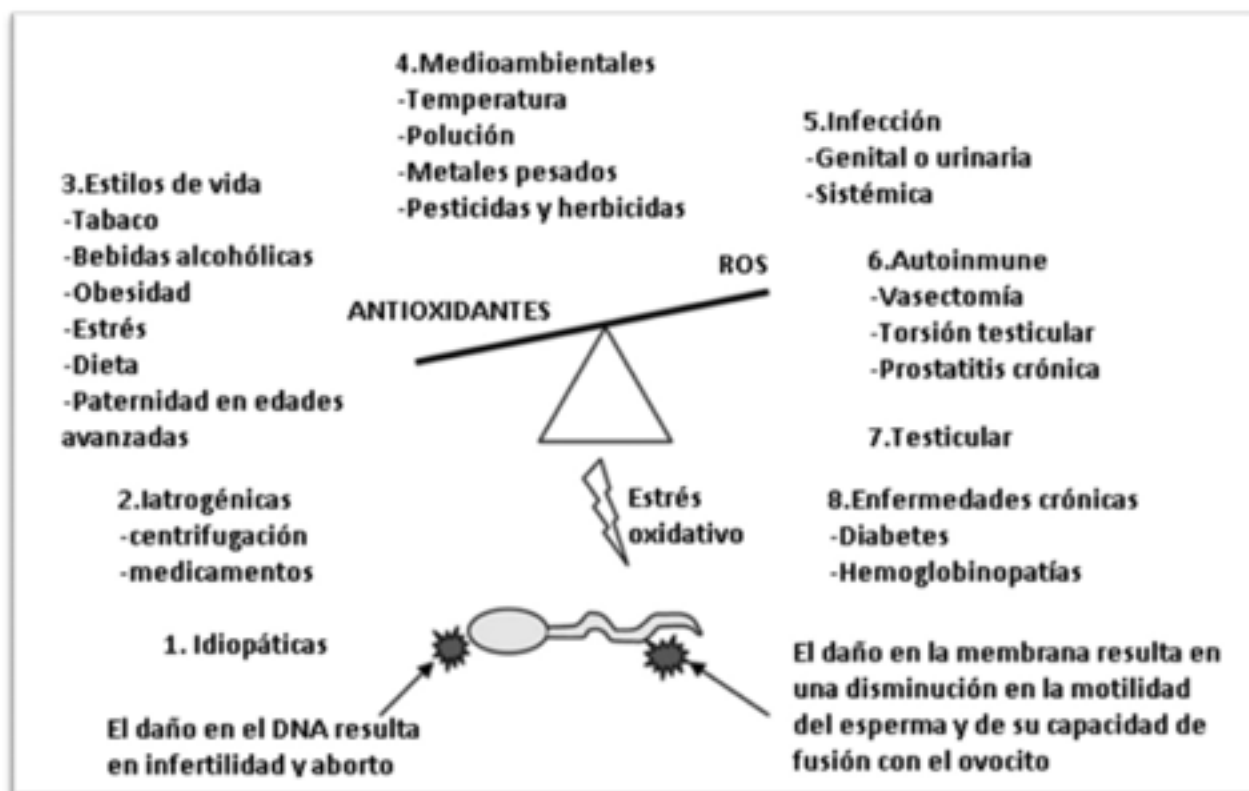


Figura 1. Causas del estrés oxidativo (Tremellen, 2008)

pretende evaluar la utilidad del test OxiSperm (Halotech®), empleada para el análisis del estrés oxidativo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han incluido un total de 69 pacientes que acuden al centro por infertilidad. Se analiza una muestra seminal de cada paciente valorando la edad y los siguientes parámetros seminales: volumen, concentración, porcentaje de movilidad progresiva, vacuolización celular medida mediante alta magnificación (microscopio Leica AM6000), y determinación cualitativa del anión superóxido mediante el kit OxiSperm (Halotech®).

El seminograma se realiza mediante el sistema CASA con el analizador digital MEII (WHO, 2010). La clasificación vacuolar utilizada en la magnificación de los espermatozoides corresponde a la publicada por Van der Zwalm et al. (2008), donde se consideran a los grupos con mayor grado de vacuolización (grado III+IV) y por tanto con peor pronóstico.

El kit OxiSperm se basa en la utilización de un Gel Reactivo (GR) que reacciona con el anión superóxido responsable del estrés oxidativo presente en el semen humano. En función de la concentración de anión superóxido, se forma un precipitado de color variable desde el rosa al morado o negro, que define el grado de estrés oxidativo de la muestra (Tabla I). El test ha de realizarse exclusivamente en muestras frescas.

Resumidamente, el protocolo consiste en calentar la agarosa del gel y

mantenerla a 37°C. Se debe mezclar en un tubo eppendorf un volumen determinado de la muestra de semen con un volumen igual del gel. Para calcular el volumen de muestra necesario se ha de dividir 1000 entre la concentración espermática del eyaculado. Homogenizar y dejar 45 minutos a 37°C, hasta que se obtiene el color que nos dará el valor cualitativo de la presencia del anión superóxido.

Para llevar a cabo el estudio estadístico se utiliza el programa UNStat2 y el BoxPlot PRO (Universidad de Navarra). Se comprueba si las variables siguen una distribución normal mediante el test de Shapiro Wilks. Los datos experimentales siguen un modelo estadístico no paramétrico, y los cálculos han sido realizados mediante el test de Kruskal Wallis.

## RESULTADOS

De los 69 pacientes analizados: 15 pacientes mostraron un grado de oxidación bajo (N1), 15 presentaron un nivel normal (N2), 25 presentaron un nivel moderado (N3) y 14 mostraron un nivel alto (N4).

Los resultados se muestran en la Tabla II y Figura 2. El test de Kruskal Wallis indica que no hay asociación entre los niveles de estrés oxidativo con la edad ni con ninguno de los parámetros seminales analizados, sugiriendo que la presencia de estrés oxidativo en el eyaculado constituye un marcador de calidad espermática independientemente de estos factores.

## DISCUSIÓN

Estudios recientes confirman la asociación entre el estrés oxidativo y la infertilidad masculina. Los ROS ejercen un papel importante en la fisiología de los espermatozoides y, por lo tanto, son imprescindibles para su correcta funcionalidad. Fisiológicamente hablando, los ROS controlan la maduración, capacitación e hiperactivación del esperma, además de intervenir en la reacción acrosómica y fusión del espermatozoide al óvulo. Pero si el equilibrio entre ROS y antioxidantes se rompe, afectará tanto a las características que regula ya comentadas anteriormente, como a la concentración, morfología y motilidad, induciendo LPO, daño al DNA y apoptosis (Aktan et al., 2013; Kothari et al., 2010).

A los ROS se les refiere como radicales libres porque son moléculas que contienen uno o más electrones desemparejados, los cuales poseen una gran cantidad de energía. Éstos buscan emparejarse con otros electrones proporcionándoles la capacidad de reaccionar con otras moléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, modificando así su estructura e incrementando el daño celular (Zini et al., 2011).

En el eyaculado humano, los ROS son producidos tanto por los espermatozoides inmaduros como por los leucocitos. Los leucocitos, especialmente los neutrófilos, activan el sistema mitocondrial y la vía de la NADPH incrementando así la producción de los ROS en caso de padecer una infección. Cuando se trata de los espermatozoides inmaduros, el exceso de citoplasma que presentan en la pieza intermedia también causa un incremento en la actividad mitocondrial aumentando la producción de los ROS; durante la espermatogénesis hay una pérdida de citoplasma para así conseguir su forma condensada y alargada característica de los espermatozoides maduros (Kothari et al., 2010; Tremellen, 2008), de esta manera parece que éstos tienen menos riesgo a sufrir estrés oxidativo. El plasma seminal contiene moléculas y enzimas antioxidantes, pero si estos sistemas se encuentran reprimidos se verá

Clasificación	Grado oxidación	Color
N1	Muy bajo	Blanco
N2	Normal	Rosa
N3	Moderado	Lila
N4	Alto	Morado

**Tabla I.** Clasificación del estrés oxidativo según el rango de colores de la prueba Oxisperm (Halotech®).

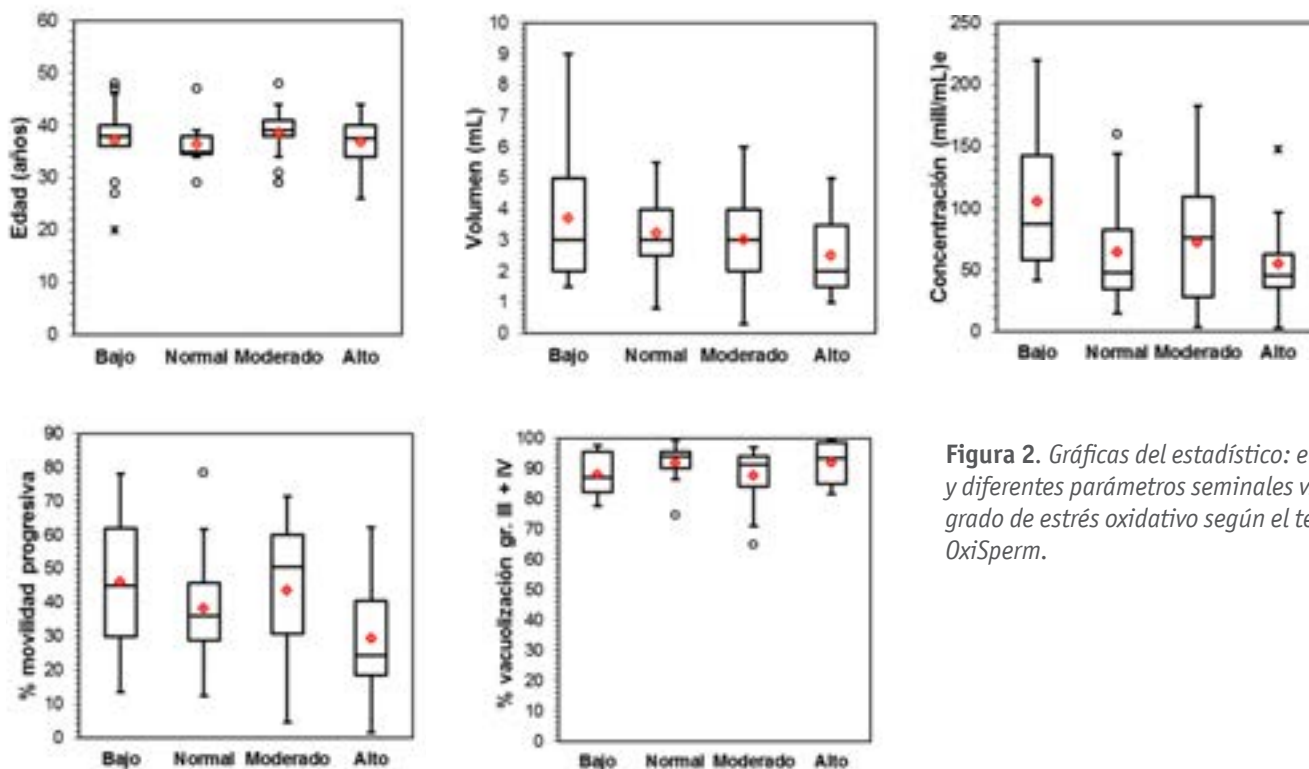


Figura 2. Gráficas del estadístico: edad y diferentes parámetros seminales vs grado de estrés oxidativo según el test OxiSperm.

afectada gravemente la funcionalidad del espermatozoide (Zini et al., 2011; Zini et al., 2009). Los espermatozoides y muchas otras células están equipadas con sistemas enzimáticos antioxidantes como

de la muestra seminal para la posterior inseminación, se retira el plasma seminal, aspecto que suele provocar una mayor susceptibilidad de las células para ser oxidadas, ya que las moléculas

aquellas muestras que presenten un grado de estrés oxidativo moderado/alto, en cuanto a la elección de la técnica y el tiempo que se tarda en procesarla. Este aspecto debe ser considerado en aquellas muestras con un elevado grado de oxidación; además es aconsejable la utilización de muestra en fresco. El test no se recomienda realizar en muestras de semen congelado, ya que la criopreservación espermática puede inducir un incremento en los niveles de estrés oxidativo modificando así el resultado del análisis. El mismo proceso de congelación/descongelación provoca muerte celular disminuyendo la calidad espermática. Dado que los espermatozoides (mayoritariamente los más inmaduros) son los principales productores de estrés oxidativo en muestras no leucocitospérmicas, (en condiciones normales se estima una producción de ion superóxido equivalente al 5% del oxígeno consumido), si mueren por el proceso de la criopreservación obtendremos como consecuencia una medida sesgada del estrés oxidativo.

Se ha observado que las muestras capacitadas por gradientes de densidad presentan niveles de oxidación más elevados que las capacitadas por Swim-

Parámetros seminales	Pruebas de Normalidad	Test Kruskal Wallis	Grados libertad
EDAD	Pvalor < 0,05	H=5,138	n-1
VOLUMEN	rechazamos	H=3,949	
CONCENTRACIÓN	Ho No	H=7,500	
%A+B	sigue una	H=6,063	
III+IV	normal	H=2,075	

\*Con un nivel de significación  $\alpha=0,05$  obtenemos una  $H_{\chi^2}=7,815$ . Las H obtenidas a partir del test de Kruskal-Wallis de las diferentes variables experimentales son más pequeñas que la  $H_{\chi^2}$  por lo tanto consideramos que no es significativo.

Tabla II. Resultado del estadístico

la superóxidodismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT), o bien moléculas antioxidantes naturales (ácido úrico, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, albúmina, vitaminas A, C y E) (Atig et al., 2013; Smith et al. 1996; Tremellen, 2008; Zini et al., 2011). Durante la capacitación

antioxidantes presentes en el plasma son retiradas junto con el plasma seminal después de la capacitación (Kothari et al., 2010; Smith et al., 1996).

La técnica del OxiSperm puede ser relevante para analizar correctamente



up. Esto podría ser debido a la ausencia total de plasma seminal que ejercería un papel protector contra el estrés oxidativo (Tremellen, 2008).

Asimismo, las terapias y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional espermático originado por un exceso de estrés oxidativo. Hay numerosos estudios que avalan el uso de antioxidantes en pacientes con infertilidad masculina, demostrando la mejoría en diferentes parámetros seminales e incluso en la tasa de embarazos (López et al., 2011; Ross et al., 2010; Showell et al., 2011). Los antioxidantes más empleados para el tratamiento de la infertilidad masculina son: L-carnitina, coenzima Q10, zinc, selenio, ácido docosahexaenoico (DHA), ácido fólico, acetil-cisteína, aspartato, y vitaminas B, C y E. Esperamos en un futuro próximo poder aportar más información acerca del valor pronóstico del test OxiSperm y poder evaluar el nivel de estrés oxidativo.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Mercè Durfort del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología en la Universidad de Barcelona, por su revisión del manuscrito. A Jennifer Pérez Carrasco de la Universidad de Barcelona por su colaboración con la estadística y sus sugerencias para el desarrollo del manuscrito.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aktan G, Doğru-Abbasoğlu S, Küçükgergin C, Kadioğlu A, Ozdemirler-Erata G, Koçak-Toker N. (2013). Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk. *Fertil Steril*; 99(5):1211-1215.

Atig F, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. (2013). Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *J Assist Reprod Genet*; [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23354588.

Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Olivito B, Azzari C, Forti G, et al. (2013). Development of a specific method to

evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reprod*; 145:227-235.

Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A. (2012). Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*; 10:109.

Jackson LW, Schistermann EF, Dey-Rao R, Browne R and Armstrong D. (2005). Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod*; 20(7):2014-2020.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plessis SS (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*; 48(5):425-435.

Lewis SE & Simon L. (2010). Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum Fertil*; 13(4):201-207.

López G, Lafuente R, Checa MA, Monqaut A y Brassesco M. (2011). Efecto del tratamiento con vitaminas, L-carnitina y coenzima Q10 en el índice de vacuolización y la fragmentación espermática en pacientes de fecundación in vitro. *Rev Int Androl*; 9(4):154-159.

Mitchell LA, De Iulii GN and John AR. (2011). The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: development of an improved methodology. *Int J Androl* ; 34(1):2-13.

Pérez E. (2007). Atención integral de la infertilidad: endocrinología, cirugía y reproducción asistida, 2ª edición, México D. F.: McGraw Hill/Interamericana.

Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*; 27(10):2908-2917.

Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, et al. (2010). A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online*; 20(6): 711-723.

Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. (2011). Antioxidants for

male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 1. Art. No.: CD007411. DOI: 10.1002/14651858.CD007411.pub2.

Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J and Lissi E. (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod*; 11(8):1655-1660.

Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility, a clinical perspective. *Hum Reprod Update*; 14(3):243-258.

Van der Zwahlen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. (2008). Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed online*; 17(5):617-627.

Venkatesh S, Shamsi MB, Deka D, Saxena V, Kumar R & Dada R. (2011). Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men. *Indian J Med Res*; 134:396-398.

World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th edition.

Zini A and Agarwal A. (2011). *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction*, 1st edition, New York: Springer Science.

Zini A and Sigman M. (2009). Are Tests of Sperm DNA Damage Review Clinically Useful? Pros and Cons. *J Androl*; 30(3):219-229.



## Modular y Ampliable



- » Cada microscopio es programable de forma independiente
- » Adaptable a cualquier incubador
- » Mínima exposición a la luz

## Time-Lapse Embriomonitorización



- » Permite el acceso remoto
- » Captura, Analiza y Reporta
- » Presenta informes automáticos completos



# RI Witness™



## Pantalla táctil de captura de datos



- » Introducción directa de los datos del paciente desde la estación de trabajo
- » Evita la manipulación continua de datos y errores de transcripción
- » Permite el acceso inmediato a los datos

## Lector por radiofrecuencia



- » Identificación automática de la identidad con etiquetas adhesivas RFID
- » Mejora el registro y control del flujo de trabajo
- » Incrementa la seguridad



## FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO, ¿ES ÚTIL SU ESTUDIO?

### SPERM DNA FRAGMENTATION, IS ITS STUDY USEFUL?

María Estomba, Yosu Franco, M<sup>a</sup> José Lázaro  
Centro Sanitario Virgen del Pilar, San Sebastián

\*email: [josufranco@hotmail.es](mailto:josufranco@hotmail.es)

Fecha recepción: 27 Marzo 2013

Fecha aceptación: 30 Abril 2013

#### RESUMEN

La fragmentación del ADN espermático está empezando a considerarse como un nuevo parámetro de calidad seminal. Actualmente, existe mucha controversia en torno a la importancia de su estudio así como de la influencia que puede tener en las tasas de fecundación, implantación, embarazo, aborto y calidad embrionaria.

El objetivo del trabajo es evaluar si existe una relación entre alguno de los parámetros de un seminograma básico y el grado de fragmentación que presenta nuestra población en estudio, además de analizar la relevancia del test de fragmentación espermática para indicar la técnica de reproducción asistida (TRA) más apropiada para cada pareja que acude a nuestra unidad. Rev Asoc Est Biol Rep 2013; 18(1):22-26.

Palabras clave: semen, seminograma, fragmentación, ADN, OMS, TRA, IDF

#### SUMMARY

DNA sperm fragmentation is beginning to consider a new parameter of the sperm quality. Nowadays, there is a big controversy about the importance of its study as well as the influence it might have in relation to the fertilization rates, implantation, pregnancy, miscarriage and embryo quality.

The aim of this study is to assess if there is a relation between some of the parameters of the spermiogram and the fragmentation degree that presents our group of study. Moreover, we would like to analyze the relevance of the sperm fragmentation test, so that we will be able to indicate the most suitable assisted reproduction technique (ART) for each couple that comes to our department. Rev Asoc Est Biol Rep 2013; 18(1):22-26.

Keywords: sperm, spermiogram, fragmentation, DNA, WHO, ART, DFI

#### INTRODUCCIÓN

El uso de las técnicas de reproducción asistida, como tratamiento para infertilidad humana, ha ido incrementándose en los últimos años. La infertilidad humana afecta a un 20% de las parejas en edad reproductiva, siendo la causa principal, en la mitad de los casos, el factor masculino. Además, el 25% de estos casos de infertilidad son de origen idiopático (Evenson et al., 1999).

La fragmentación del ADN espermático es una de las alteraciones que afecta al gameto masculino, estando íntimamente relacionada con defectos genéticos y epigenéticos. En estos últimos años el estudio de la fragmentación de ADN ha ido adquiriendo mayor relevancia en las Unidades de Reproducción Asistida, aunque existe una gran controversia acerca de su valor predictivo.

En el laboratorio de andrología, el estudio del semen que se realiza de

manera rutinaria se basa en la guía de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Según los criterios de la misma, el seminograma consta del estudio de una serie de 5 parámetros principales: volumen, pH, movilidad, concentración y morfología; sin embargo, este tipo de estudios sobre la calidad seminal tiene un poder limitado a la hora de predecir el éxito en el resultado de las TRA, ya que aproximadamente el 15% de los varones infértiles presentan un seminograma normal (Guzik et al., 2001).



Por ello, surge la necesidad de evaluar la integridad del contenido genético del espermatozoide y la posible relación de las alteraciones en la doble cadena de ADN con la infertilidad de origen idiopático masculino (Evenson et al., 1999).

Actualmente, el estudio de la fragmentación seminal está siendo considerado como un nuevo parámetro que puede incorporarse en un estudio básico de semen, a pesar de la controversia que existe en la literatura científica acerca de la influencia del grado de fragmentación espermática y el resultado de la técnica de reproducción realizada (Van der Zwalm et al., 1991; Janny et al., 1994)

La importancia de determinar el índice de fragmentación espermático radica en la relación que existe entre este parámetro y la tasa de fecundación, tasa de implantación, calidad embrionaria, e incluso la tasa de aborto (Shamsi et al., 2011). Según el estudio publicado por el grupo de Luke Simon en 2011, se observa una correlación negativa entre el nivel de fragmentación, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria obtenida (Simon et al., 2011).

En cuanto a la calidad embrionaria, varios autores encuentran una relación negativa entre el porcentaje de fragmentación espermática y la calidad de los embriones obtenidos (Evenson et al., 1999; Tesarik et al., 2004; Avendaño et al., 2010). Otros estudios han sugerido que este tipo de daño en el material genético se manifiesta durante la etapa de implantación, incluso posteriormente (efecto paterno tardío) (Tesarik et al., 2004). Se ha observado que la presencia de niveles altos de fragmentación en la muestra seminal bloquean el desarrollo de los embriones a estadio de blastocisto (Benchaib et al., 2007; Seli et al., 2004), siendo este bloqueo un proceso comprendido entre la etapa de activación del genoma embrionario y el comienzo de la formación del blastocisto.

También se ha visto una mayor tasa de aborto en aquellos pacientes con un índice de fragmentación (IDF) elevado a los que se les ha realizado

ICSI; sin embargo no se han visto estas diferencias cuando la fecundación se realizó mediante FIV convencional (Borini et al., 2006; Benchaib et al., 2007).

Por otro lado, estudios publicados sugieren un cambio de indicación en la TRA a realizar, ya que se ha observado que la tasa de embarazo desciende al realizar IAC cuando el IDF es elevado; sin embargo, no parece verse influenciada al realizar FIV o ICSI (Bungum et al., 2004; Saleh et al., 2003). Otros trabajos han visto una tasa de embarazo más alta mediante ICSI, en aquellos pacientes cuyo IDF es superior al valor de corte (Bungum et al., 2006).

El objetivo de nuestro estudio fue determinar si existe relación alguna entre los parámetros de un seminograma básico y el índice de fragmentación espermático, así como valorar si el resultado de la fragmentación modificaría la técnica indicada en función del diagnóstico del seminograma previo. También comparamos los resultados obtenidos teniendo en cuenta los criterios OMS 99 con respecto a los criterios OMS 2010.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio retrospectivo realizado en el Centro Sanitario Virgen del Pilar de San Sebastián desde mayo de 2010, en el que fueron analizados un total de 264 varones.

Las muestras fueron recogidas por masturbación, en botes estériles, con un periodo de abstinencia de entre 2 y 6 días, y con un tiempo de transporte de la muestra inferior a 1 hora.

Aproximadamente 30 minutos más tarde de la recepción de la muestra, y tras observar su licuefacción a temperatura ambiente, se realizó el análisis de los parámetros del seminograma siguiendo los criterios de la OMS 99 procesando posteriormente las muestras mediante la técnica de *swim-up*.

Las muestras fueron diluidas en proporción 1:1 y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 400 g; el pellet resultante fue incubado en

un volumen final de 400 µl de medio de cultivo. Tras 1 hora de incubación a 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>, se recuperó el sobrenadante, contabilizando el número de espermatozoides móviles mediante cámara Makler, procediendo posteriormente al estudio de la fragmentación.

El REM (Recuento de Espermatozoides Móviles) obtenido nos indicará el tipo de técnica a realizar a la pareja en estudio (desde el punto de vista masculino), siendo los criterios de inclusión para cada técnica: mayor de 5 millones se indica una IAC; entre 3 - 5 millones, FIV convencional; y menor de 3 millones, ICSI.

El análisis de la fragmentación del ADN espermático fue realizado en la muestra capacitada mediante el SCD test (Sperm Chromatin Dispersion), que se basa en la valoración de la presencia/ausencia y tamaño de los halos de dispersión de la cromatina. Para ello se utilizó el kit de Halosperm según protocolo (Fernández et al., 2005).

El porcentaje de fragmentación fue determinado mediante el conteo de 300 espermatozoides por observador a 100X en un microscopio de campo claro bajo aceite de inmersión, siendo cada muestra valorada por dos observadores. El valor umbral utilizado para considerar el porcentaje de fragmentación como alterado fue del 30%.

En aquellos pacientes en los que hubo una alteración en la fragmentación, la TRA realizada fue un ICSI, independientemente del resultado obtenido en el estudio del seminograma.

En cuanto al test estadístico utilizado, los datos fueron analizados mediante el estadístico  $\chi^2$ , considerando estadísticamente significativo  $p < 0,05$ , utilizando el programa SPSS para Windows.

#### RESULTADOS

Del total de los varones analizados, la incidencia de fragmentación alterada de ADN espermático fue de un 11% (29/264).

Teniendo en cuenta esta incidencia, los pacientes fueron divididos en dos grupos, siendo los varones con resultado de fragmentación (IDF) menor al 30% nuestro grupo control, y aquellos cuya fragmentación era igual o mayor al 30% nuestro grupo de estudio.

Los resultados obtenidos en cuanto a la relación entre los distintos parámetros del seminograma y la fragmentación de ADN espermático se muestran en la tabla I:

porcentaje de fragmentación de ADN, siendo este resultado estadísticamente muy significativo ( $p < 0,001$ ).

Respecto al parámetro de teratozoospermia, la incidencia observada es ligeramente mayor en el grupo de estudio. Nuestros resultados sugieren que hay una cierta tendencia que relaciona la morfología y el índice de fragmentación, pero los resultados no presentan diferencias significativas, posiblemente debido al pequeño

Como puede observarse en la tabla II, un 14% de los pacientes tuvieron una indicación de FIV convencional y en un 45% la técnica de elección fue una IAC, previo al estudio de la fragmentación. Tras el estudio de la misma y basándonos en la literatura publicada, donde la realización de un ICSI en pacientes con un  $IDF > 30\%$  mejora las tasas de embarazo (Bungum et al., 2006), nuestros resultados muestran que un 59% de los varones pertenecientes a nuestro grupo de estudio tuvieron un cambio de indicación de la técnica a realizar.

	Astenozoospermia		Teratozoospermia		Oligozoospermia	
	OMS 99	OMS 10	OMS 99	OMS 10	OMS 99	OMS 10
<b>IDF &lt;30%</b>	59 (25%)	30 (13%)	235 (100%)	112 (48%)	28 (12%)	21 (9%)
<b>IDF ≥30%</b>	25 (86%)	16 (55%)	29 (100%)	18 (64%)	9 (32%)	8 (28%)

Tabla I: Prevalencia de los distintos parámetros que se estudian en un seminograma, según los criterios establecidos por la OMS 99 y 2010.

Como puede observarse en la tabla I, parece que las principales alteraciones del seminograma podrían estar relacionadas con el daño en el contenido genético del espermatozoide, aunque no todas en la misma medida; esta posible asociación se muestra más claramente en la gráfica 1.

A la vista de nuestros resultados, siguiendo tanto los criterios de la OMS del 99 como del 2010, el parámetro de astenozoospermia tiene una relación inversamente proporcional con el

tamaño muestral de uno de los grupos.

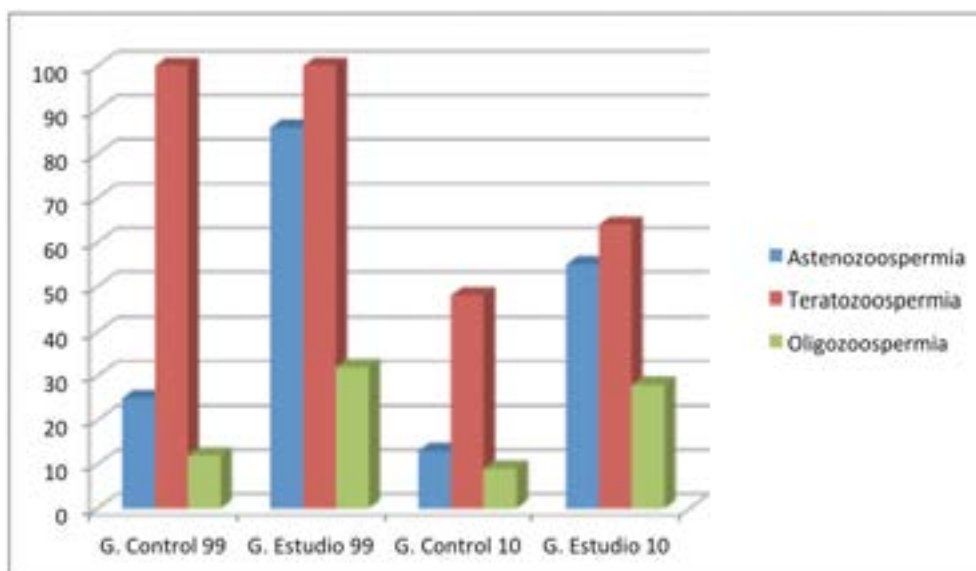
En cuanto a la concentración espermática, se observa que existe una relación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre oligozoospermia y fragmentación de ADN alterada, tanto con los parámetros de la OMS del 99 como con los de 2010.

En la tabla II se muestra el cambio de indicación una vez realizado el estudio de la fragmentación.

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren la importancia de estudiar la integridad del contenido genético del espermatozoide.

Al estudiar la posible relación existente entre los principales parámetros del seminograma y la fragmentación del ADN, hemos observado que existe una relación estrecha entre la alteración de la movilidad y el daño en el contenido genético, tal y como observaron distintos autores (Sills et al., 2004; Chen et al., 2006; Cohen-Bacrie et al., 2009; Muriel et al., 2006; Zini et al., 2001; Lin et al., 2008). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con los trabajos citados en la literatura (Tomlinson et al. 2001; Sills et al., 2004; Chen et al.,



Gráfica 1. Relación entre la fragmentación de ADN y los parámetros del seminograma.

	Total	IAC	FIV	ICSI
<b>IDF ≥30%</b>	29	13 (45%)	4 (14%)	12 (41%)
<b>IDF &lt;30%</b>	235	174 (74%)	23 (10%)	38 (16%)

Tabla II. Número de pacientes a los cuales se cambia la indicación.

2006; Zini et al., 2001), observando una mayor incidencia de baja concentración de espermatozoides en la población cuyo índice de fragmentación es elevado.

En cuanto a la morfología, a diferencia de otros estudios publicados en los que correlacionan fragmentación y morfología (Tomlinson et al., 2001; Sills et al., 2004; Chen et al., 2006), nuestros resultados no muestran una clara asociación con la fragmentación espermática, aunque sí una ligera tendencia a ella, lo que puede ser justificado por el tamaño muestral del estudio.

La heterogeneidad existente en la población a estudiar, así como la presencia de varias alteraciones simultáneas en los diferentes parámetros del seminograma, dificultan el establecer una relación directa y única con la fragmentación.

Por otra parte, basándonos en estudios publicados, en nuestro centro el criterio elegido para indicar la TRA apropiada para cada pareja viene determinado no sólo por los parámetros del seminograma, sino también por el índice de fragmentación. Estudios como Bungum et al. (2004) y Duran et al. (2002) nos muestran la necesidad de un cambio de indicación de IAC a FIV/ICSI en pacientes con muestras que contienen una fragmentación elevada. Además, Benchaib et al. (2007) y Bungum et al. (2004) aconsejan que en este tipo de pacientes la técnica de elección sea un ICSI, ya que han observado un aumento notable en el éxito de los resultados, no solo por poder eliminar la fragmentación de la muestra, sino porque nos permite también poder seleccionar el espermatozoide con mejor morfología, pudiendo de esta forma eliminar esta variable.

En definitiva, analizando nuestros resultados, el estudio de la fragmentación debería considerarse como un parámetro de rutina en el estudio del seminograma para poder determinar con mayor fiabilidad la TRA más adecuada a cada paciente. En nuestro trabajo, 17 pacientes diagnosticados con un IDF >30% fueron susceptibles de cambio de técnica, lo que nos puede ayudar a predecir de forma más personalizada cuál es el camino a seguir con cada paciente.

Son necesarios estudios prospectivos para evaluar el efecto de la fragmentación en el éxito de las TRA, así como de los procesos que la originan, con el fin de poder elegir los espermatozoides que posean el ADN íntegro y mejorar los resultados en el laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avendaño C, Franchi A, Duran H, et al. (2010). DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril*; 94:549-557.

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, et al. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*; 87: 93-100.

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D et al. (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*; 21: 2876-2881.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, et al. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod*; 19:1401-1408.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, et al. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*; 22:174-179.

Chen Z, Hauser R, Trbovich A, et al. (2006). The relation between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl*; 27: 112-120.

Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménéz et al. (2009). Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril*; 91(5): 1801-1805.

Duran EH, Morshedi M, Taylor S et al. (2002). Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod*; 17: 3122-3128.

Evenson DP, José IK, Marshall D, et al. (1999). Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reprod*; 14:1039-1049.

Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*; 84(4):833-842.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P et al. (2001). Sperm Morphology, motility, and concentration in infertile and fertile men. *New Engl J Med.*; 345:1388-1393.

Janny L and Menezo YJR. (1994). Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev*; 38: 36-42.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee et al. (2007). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril*; 90(2):352-359.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, et al. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*; 69:528-32.

Muriel L, Meseguer M, Fernández JL, et al. (2006). Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 1; 738-744.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*;79: Suppl 3,1597±605.

Seli E, Gardner DK et al. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*; 82: 378-383.

Shamsi M, Imam S, Dada R. (2011). Sperm

DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet.*; 28:1073-1085.

Simon L, Lutton D, McManus J, et al. (2011). Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril*; 95: 652-657.

Sills ES, Fryman JT, Perloe M, et al. (2004). Chromatin fluorescence characteristics and standard semen analysis parameters: correlation observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaluation. *J Obstet Gynaecol*; 24:74-77.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. (2004). Late, but not early, paternal effect on human

embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*; 19: 611-615.

Tomlinson MJ, Moffatt O et al. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16; 2160-2165.

Vanderzwalmen P, Bertin-Segal G, Geerts L et al. (1991). Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim up procedures. *Hum Reprod*; 581-588.

Zini A, Bielecki R, Phang D et al. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*; 75:674-677.

## eppendorf



## Incube a su manera

### Incubadores Eppendorf New Brunswick CO<sub>2</sub>

Los incubadores de CO<sub>2</sub> de Eppendorf proporcionan las condiciones ideales para un amplio rango de aplicaciones, expandiendo sus posibilidades en cultivo celular, con capacidad desde 14L hasta 170L.

- > Control de contaminación, gracias a su cámara sellada, su opción de desinfección a alta temperatura y la cámara de cobre antimicrobiana.
- > Tres opciones de control de O<sub>2</sub> para condiciones de oxigenación especiales.



[www.eppendorf.es](http://www.eppendorf.es)

Eppendorf® es una marca registrada y New Brunswick™ es una marca comercial registrada de Eppendorf AG, Alemania. Todos los derechos reservados, incluidos gráficos e imágenes. Copyright © 2013 by Eppendorf.



## ¿POR QUÉ LOS SOCIOS DE ASEBIR PARTICIPAN TAN POCO EN LOS TEMAS DE DEBATE DE NUESTRA REVISTA? (PARTE II)

Jorge Cuadros, Marga Esbert  
Vocalía de Publicaciones  
Junta Directiva de ASEBIR

Dicen que segundas partes nunca fueron buenas (que se lo digan a “El Padrino, parte II”). Sin embargo, y dado que la Vocalía de Publicaciones de la presente Junta Directiva se despide con este número de la Revista ASEBIR (el número de Diciembre corresponde a los abstracts del Congreso ASEBIR de Sevilla), hemos decidido hacer una última reflexión sobre esta revista, que es nuestra, y en especial sobre esta sección de Debate.

Como decíamos en nuestro comentario en el Debate de diciembre 2012, nos equivocamos entonces, y nos hemos vuelto a equivocar ahora, pensando que para el presente número de junio 2013 abundarían los comentarios, explicando los motivos por los que los socios no muestran interés en escribir en la sección de Debate. Quizás la próxima Vocalía de Publicaciones se plantee revisar este tema y reconducirlo, por ejemplo y como ya sugerimos, como una sección de “Cartas al Editor”.

De todas maneras, han ocurrido dos acontecimientos relacionados con este tema que deberían hacernos reflexionar, siempre partiendo del hecho de que la Revista ASEBIR es el órgano de expresión de los embriólogos clínicos. En primer lugar, ya es un hecho la publicación de la nueva revista “Medicina Reproductiva y Embriología Clínica”, en cuya elaboración ASEBIR participará junto con la Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Esta buena noticia trae como consecuencia que los artículos originales que antes eran publicados en la Revista ASEBIR ahora serán reconducidos hacia la nueva publicación. En segundo lugar, y relacionado en parte con la gestación de esta nueva revista, la de ASEBIR ha pasado a editarse on line, acorde con los nuevos tiempos, y con un ahorro

significativo de recursos económicos y medioambientales. Sin embargo, el hecho de que la Revista ASEBIR en su formato on line haya perdido los artículos originales, sólo debería reforzarnos la idea de que debemos potenciar los otros apartados de la revista. En estos años hemos tenido como artículos de Actualidad algunas revisiones muy interesantes sobre temas diversos; nuestros jóvenes investigadores se han esforzado escribiendo artículos de calidad para el Aula Joven, prueba de ello los premiados con una beca de inscripción para el Congreso de Sevilla; y la contribución de los expertos en los artículos de Formación Continuada hacen de nuestra Revista ASEBIR una publicación en la que debería apetecernos escribir. En el Debate, también.

Dice Manuel Ardoy, nuestro presidente, que el futuro es nuestro. Eso significa que el futuro de ASEBIR y de la Revista ASEBIR será como queramos que sea.



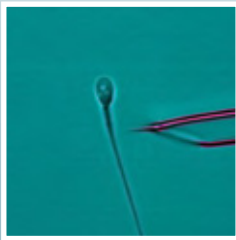
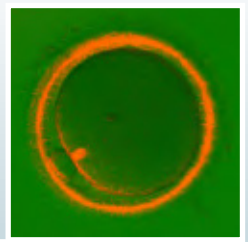
Alarma



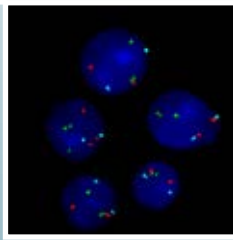
Time-lapse



Polarización



IMSI



FISH



Biopsia TFE

# Think Quality

## ■ Herramientas de precisión

Sistemas de microscopía para observación y micromanipulación

## ■ Control permanente de parámetros

Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

## ■ Selección de los mejores candidatos

Evaluación de la calidad oocitaria y del espermatozoides, y selección de los mejores embriones

## ■ Mejores decisiones

Haga un mejor análisis teniendo toda la información

# OLYMPUS

Your Vision, Our Future

Olympus Iberia S.A.U • [informacion.micro@olympus.es](mailto:informacion.micro@olympus.es) • [www.olympus.es](http://www.olympus.es)

## GASTRULACIÓN: PROCESO CLAVE EN LA FORMACIÓN DE UN NUEVO ORGANISMO

### **GASTRULATION: KEY STEP IN A NEW ORGANISM FORMATION**

Carmen López-Sánchez<sup>1</sup>, Virgilio García-López<sup>1</sup>, José Mijares<sup>2</sup>, José Antonio Domínguez<sup>3</sup>, Francisco M. Sánchez-Margallo<sup>2</sup>, Ignacio Santiago Álvarez-Miguel<sup>1</sup>, Virgilio García-Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología. Universidad de Extremadura. Badajoz

<sup>2</sup>Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón. Cáceres.

<sup>3</sup>Instituto Extremeño de Reproducción Asistida (IERA). Badajoz.

email: [virginio@unex.es](mailto:virginio@unex.es)

#### RESUMEN

Tras la implantación del blastocisto en el endometrio acontecen durante el desarrollo embrionario una serie de procesos morfogenéticos de significación biológica altamente relevante. Desde un embrión bilaminar, constituido por epiblasto e hipoblasto, se configura un embrión trilaminar, constituido por ectodermo, mesodermo y endodermo, debido a un proceso denominado gastrulación, un proceso que no es exclusivo de vertebrados, basado en un proceso de división, migración y diferenciación celular. En el presente trabajo realizamos una descripción precisa del proceso de gastrulación, con especial referencia a las estructuras que sucesivamente se van formando, y analizando los posibles factores implicados en la determinación de cada uno de ellos. Rev Asoc Est Biol Rep 2013; 18(1):29-41.

Palabras clave: Desarrollo, Gastrulación, Blastocisto, Epiblasto, Hipoblasto, Diferenciación celular, Factores moleculares.

#### SUMMARY

After the blastocyst implantation in the endometrium, a series of highly relevant biological significance morphogenetic processes occur during embryonic development. From a bilaminar embryo, consisting of epiblast and hypoblast, configure a trilaminar embryo, formed by ectoderm, mesoderm, and endoderm, due to a process named Gastrulation, which is not exclusive of vertebrates, based on a process of division, migration and cellular differentiation. This work carry out a precise description of the Gastrulation process, with special reference to the structures progressively formed, and analyzing the possible factors involved in their induction and determination. Rev Asoc Est Biol Rep 2013; 18(1):29-41.

Key words: Development, Gastrulation, Blastocyst, Epiblast, Hypoblast, Cellular differentiation, Molecular factors.

#### INTRODUCCIÓN

El embrión es transferido a la cavidad uterina en las técnicas de reproducción asistida (RA) en la etapa de blastocisto, o bien en alguna de las fases previas a su formación. El embriólogo clínico está familiarizado con las etapas del desarrollo embrionario preimplantacional, y las nuevas tecnologías, como es el caso de la embriocinética (Campbell et al., 2013), que aportan constantemente nuevos conocimientos sobre las particularidades de este proceso.

En cualquier caso, el proceso de implantación comienza cuando el embrión eclosiona de la zona pelúcida, desencadenándose un complejo proceso de placentación que suele ser seguido por parte de los embriólogos, aunque de forma indirecta, por la formación del saco embrionario, que se observa ecográficamente.

Sin embargo, de forma simultánea con la implantación, mediante la invasión del endometrio por parte del trofoectodermo, la masa celular interna (MCI) del blastocisto sufre una

serie de vertiginosos cambios que conllevarán finalmente a la formación del embrión propiamente dicho. Estas etapas del desarrollo que conllevan la formación de las capas germinales y si cabe más relevante aún, la formación del futuro plan corporal del organismo, están gobernadas por el proceso de gastrulación, una etapa crucial del desarrollo donde además se establece la identidad propia de cada organismo y que supone la especificación de grupos celulares para la formación de los distintos órganos.

En este artículo mostramos una visión general de los acontecimientos que tienen lugar en la MCI, desde la etapa de blastocisto hasta que el futuro organismo ya se puede identificar con una estructura básica similar a la que tendrá en etapas más avanzadas del desarrollo, incluyendo el adulto.

Conceptualmente, es un proceso transcendental pues en esta fase se consigue que desde un grupo indeterminado de células y con pluripotencialidad para originar cualquier tipo celular, se establezcan los esbozos de los futuros órganos en sus posiciones correctas y que las células se comprometan a sus destinos de forma prácticamente irreversible. Aunque las etapas previas a la gastrulación son muy diferentes entre los mamíferos y el resto de los vertebrados, debido principalmente a diferencias en el proceso de segmentación, que a su vez está determinado por el tamaño de los gametos femeninos (huevos), cuando se forma el disco embrionario y consecuentemente se inicia la gastrulación, los mecanismos de desarrollo para establecer el futuro organismo siguen patrones muy similares, independientemente del grupo de vertebrados que consideremos. Esto es un hecho relevante, denominado convergencia evolutiva, que indica la relevancia del mecanismo de gastrulación. Básicamente podríamos considerar a esta orquestada secuencia de procesos de desarrollo que ocurre durante la gastrulación como una especie de cuello de botella por el que han de pasar todos los vertebrados para conseguir la formación de un nuevo organismo. Debido a esto, gran parte de los datos más relevantes del proceso de gastrulación han sido obtenidos del estudio de animales más asequibles para la experimentación y manipulación que los embriones de mamíferos, como es el caso de los embriones de aves. Por lo tanto, gran parte de la información experimental que ofreceremos se ha conseguido con embriones de gallina, aunque es perfectamente equiparable y trasladable no sólo al resto de los vertebrados sino también y más relevantemente a la especie humana.

## EL DISCO EMBRIONARIO: EPIBLASTO E HIPOBLASTO

Aunque cuando el blastocisto es transferido la MCI está formada por un número relativamente pequeño de células (aproximadamente 50), la proliferación celular incrementa rápidamente este número, sin que apenas se produzca ya reducción en el volumen celular (característica que ha marcado las divisiones anteriores durante el proceso de segmentación). A la vez que se produce este incremento en el número de células, la MCI deja de ser una estructura sin organización aparente y por procesos complejos, aún poco conocidos, se constituye en una masa ligeramente aplanada o discoidal que recibe el nombre de disco embrionario (Figura 1). Las células de este disco comienzan a organizarse en dos láminas: una superior, ya que coincidirá con la región dorsal del futuro embrión, y que en estas primeras etapas limita la cavidad amniótica, y otra inferior, ya que limita con el saco vitelino del embrión y define la parte ventral del embrión (Figura 1A).



Figura 1. Secuencia de dibujos que ilustran los cambios característicos del proceso morfogenético basado en la formación del embrión trilaminar a partir de la constitución del disco embrionario.

Figura 1A. Observación desde la cavidad amniótica, apreciándose las células del epiblasto constituyendo el nódulo de Hensen y la línea primitiva.

Estas dos capas reciben el nombre de epiblasto e hipoblasto y son las que constituyen en conjunto el blastodermo, y puede considerarse

la primera determinación de las células que van a dar lugar al embrión propiamente dicho, ya que las células del trofoectodermo han seguido un proceso de diferenciación paralelo para dar lugar a las distintas estructuras placentarias.

El disco embrionario y más concretamente el blastodermo, es el origen de todos los tejidos embrionarios y parte de los tejidos extraembrionarios, y se ha establecido ya como una bicapa de varios cientos de células, aproximadamente en el día 10 del desarrollo embrionario (Rawles, 1943).

La formación de un nuevo organismo a partir de esta estructura necesita por una parte del establecimiento de unos ejes corporales para establecer la identidad anterior-posterior, dorsal-ventral y la del eje de simetría (izquierda-derecha), y por otra parte la formación de las distintas capas o láminas que con sus tipos celulares dan lugar a todos los órganos: ectodermo, mesodermo y endodermo (Rosenquist, 1970).

Los mecanismos mediante los cuales se establecen los ejes corporales en los vertebrados son muy complejos y posiblemente estén de alguna manera establecidos incluso desde la propia fecundación (véase artículo de Formación Continuada de Álvarez-Miguel et al., 2006). La explicación de cómo unas células del disco embrionario consiguen establecer una identidad posterior y anterior queda fuera del enfoque de este trabajo, pero en cualquier caso esta especificación de unas células del blastodermo va a determinar que se inicie el complejo proceso de migración y relocalización de células, orquestado principalmente por la línea primitiva, que se conoce como gastrulación.

## GASTRULACIÓN: LA LÍNEA PRIMITIVA Y LA MIGRACIÓN CELULAR

Uno de los procesos fundamentales en las fases iniciales del desarrollo embrionario consiste en la formación de una tercera capa embrionaria, de tal modo que el disco embrionario



bilaminar, constituido por epiblasto (o ectoblasto) e hipoblasto, llegará a configurarse en un disco trilaminar, constituido por ectodermo (epiblasto en las fases previas), endodermo y mesodermo (García-Martínez et al., 1993; 1997).

En fases precoces del desarrollo, las células del ectoblasto (epiblasto) inician dos procesos fundamentales, que ocurren de forma concomitante. En primer lugar, las células se dividen, proliferan, incrementan su número, lo cual conlleva al segundo aspecto, necesitan migrar, desplazarse hacia

formar la tercera capa, el mesodermo. Las células ectodérmicas, con gran capacidad de proliferación, están sometidas a diferentes corrientes de migración celular, que se identifican en dos direcciones, fundamentalmente: una corriente de células en sentido látero-medial, y una corriente de migración celular en sentido rostro-caudal. De este modo, cuando las células más laterales y las células más rostrales llegan al centro del embrión, se invaginan, a nivel de la línea media, constituyendo la denominada línea primitiva (Figura 1B, C), estructura longitudinal situada a lo largo del eje rostro-caudal del embrión,

de característica fundamentalmente dinámica, lo cual indica que la línea primitiva es diferente en cada momento del desarrollo, dependiendo de las células que van ingresando a través de ella, para formar la tercera capa, el mesodermo, entre ectodermo y endodermo, constituyéndose así el embrión trilaminar (Alvarez et al., 2006).

La línea primitiva es pues el aspecto morfológico que presentan las células cuando están ingresando a través de ésta para formar el mesodermo. Las células que siguen una migración rostro-caudal se invaginan a nivel de la zona más rostral de la línea primitiva, y forman sucesivamente, a lo largo de la capa media del embrión, una estructura de aspecto alargado, central, como una cuerda que recorre el embrión, denominada la notocorda, o también mesodermo axial, en el eje embrionario longitudinal. Las células que siguen una migración látero-medial, al invaginarse a través de la línea primitiva, formarán, a cada lado del embrión, el mesodermo propiamente dicho.

El análisis detallado de la migración celular a través de la línea primitiva pone de manifiesto que puede distinguirse un sector, claramente definido, de significación funcional diferente, en el extremo más rostral de la línea primitiva, en la posición donde se están invaginando las células de la posición rostral del ectodermo, las células que darán lugar a la notocorda (Schoenwolf et al., 1992). Esta zona inicial, rostral, de la línea primitiva se denomina, por sus características embrionarias, el organizador, descrito en ratón en los primeros estudios embrionarios, denominándose, en honor al autor que lo describió, el nódulo de Hensen. Se trata pues también de una estructura dinámica, que se encuentra en el extremo rostral de la línea primitiva, que modifica su posición en sentido rostro-caudal a medida que van ingresando mayor número de células para ir configurando la notocorda, de rostral a caudal, en el embrión (Figura 1D).

Es interesante hacer especial énfasis en el hecho de que la notocorda, formada a partir de la línea de migración celular rostro-caudal, de las células que se

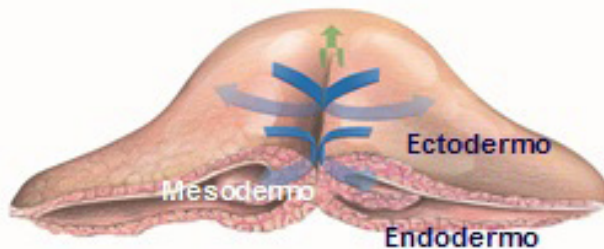


Figura 1B. Sección transversal ilustrando la migración de las células del epiblasto a través del nódulo de Hensen y la línea primitiva, para ir formando progresivamente el mesodermo.

nuevas localizaciones y ocupar nuevas posiciones en el embrión. Estos procesos celulares hacen que numerosas células del epiblasto se dirijan hacia el hipoblasto, desplazando las células del mismo, para ser sustituidas por una nueva capa celular, el endodermo. En este momento, la capa de células denominada ectoblasto comienza a denominarse ectodermo (García-Martínez y Schoenwolf, 1992; Schoenwolf et al., 1992; Hatada y Stern, 1994).

A partir del embrión bilaminar, constituido por ectodermo y endodermo, se inicia el proceso de gastrulación, mediante el cual se constituye la tercera capa embrionaria, el mesodermo, que se localizará entre las dos capas anteriores (Figura 1B).

El inicio del proceso de gastrulación se caracteriza por los cambios morfogénéticos que tienen lugar en el embrión, ya que las células del ectodermo se dividen y migran, para



Figura 1C. Embrión en fase de gastrulación, sometido a una sección transversal, que permite la observación de las corrientes de migración celular y el establecimiento de las tres capas: ectodermo, mesodermo y endodermo. Nótese en el polo cefálico la región de la placa precordial, donde el ectodermo y el endodermo están fusionados, impidiendo el paso de células de la notocorda en sentido rostral.

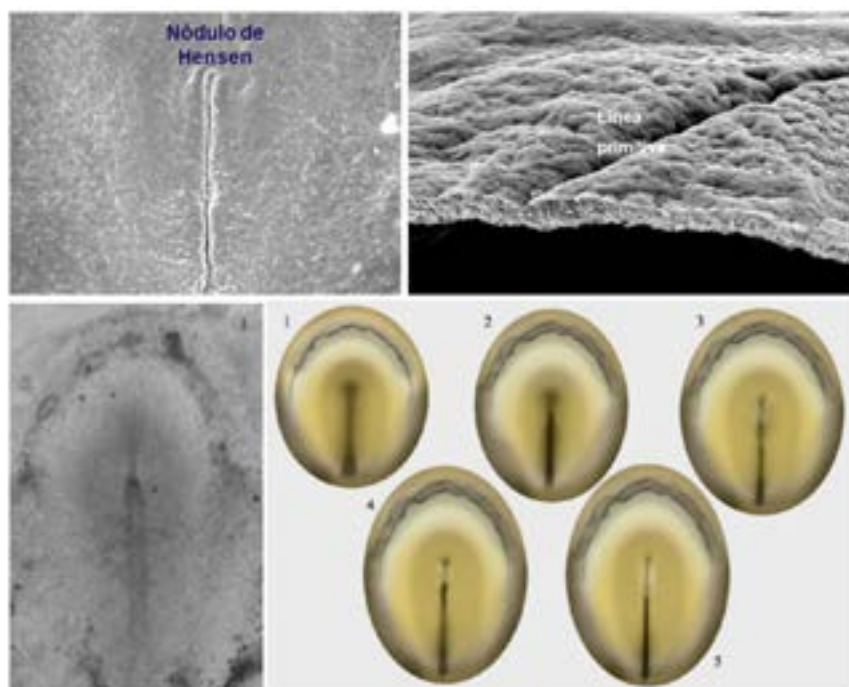


Figura 1D. La lámina ilustra el proceso de formación del nódulo de Hensen y la línea primitiva. Las imágenes superiores corresponden a microscopía electrónica de barrido.

En el lado izquierdo una visión del nódulo de Hensen y la línea primitiva; a la derecha el embrión seccionado mostrando la constitución de las capas características. Las imágenes inferiores muestran a la izquierda una microfografía óptica de un embrión de ave en fase de gastrulación, ilustrado secuencialmente (del 1 al 5) en los esquemas de la imagen de la derecha.

invaginan a través del nódulo de Hensen, no llega a configurarse entre las capas ectodérmica y endodérmica desde las posiciones más craneales o rostrales del embrión, ya que a este nivel existe una íntima unión entre ectodermo y endodermo, donde no pueden penetrar células de la notocorda. Esta zona rostral embrionaria, donde ectodermo y endodermo están fuertemente fusionados, y no permiten la llegada de células que puedan formar notocorda se denomina la placa precordial (Figura 1C), de gran significación funcional en la constitución del extremo cefálico del eje longitudinal embrionario.

Las características dinámicas del proceso de gastrulación determinan el aspecto progresivo del desarrollo en estas fases iniciales. Dado que las células de las posiciones rostrales inician estos procesos de división y migración antes que las células de las posiciones embrionarias más caudales, el proceso del desarrollo embrionario sigue también una secuencia rostro-

caudal. Un embrión mostrará ya sus tres capas embrionarias, ecto-, meso- y endo-dermo, en el sector rostral (craneal, o cefálico), mientras que el sector caudal aún estará en fase de formación de línea primitiva (Figura 1C). Es pues de gran relevancia observar que el nódulo de Hensen, y el resto de la línea primitiva, se desplazan en el embrión en sentido cráneo-caudal durante el desarrollo; el nódulo de Hensen va ocupando sucesivamente una posición más caudal, y por ello la línea primitiva va siendo progresivamente de una menor longitud (Figura 1D).

## DESTINO Y ESPECIFICACIÓN CELULAR DURANTE LA GASTRULACIÓN

La configuración de un embrión trilaminar, constituido como consecuencia del proceso de gastrulación, aún mantiene el aspecto morfológico bidimensional, ya que dos de sus ejes (longitudinal y transversal) siguen predominando llamativamente sobre su tercer eje, determinado por el grosor, extremadamente fino, del

embrión, a pesar de tener ya tres láminas (Lopez-Sanchez et al., 2001).

Es a partir de esta fase cuando el embrión comienza a crecer para ir adquiriendo progresivamente su aspecto tridimensional. Para ello el embrión mostrará dos vías fundamentales de actuación: i) cada una de las tres capas se desarrollará para formar los órganos y aparatos que específicamente se diferenciarán a partir de cada una de ellas, y ii) el cuerpo embrionario se incurvará en sentido céfalo-caudal y lateral, para ir configurando el cuerpo embrionario tridimensional. Ambos procesos tienen lugar de forma concomitante, de tal modo que a la vez que se diferencian cada una de las capas embrionarias, el cuerpo embrionario se va plegando.

Cada una de las tres láminas embrionarias seguirá patrones de diferenciación y morfogénesis específicos para cada una de ellas (Figura 2).

Aunque el desarrollo de cada capa dará lugar a distintos órganos, aparatos y sistemas, es de especial relevancia tener en cuenta que el desarrollo de cada capa es coincidente y concomitante en el tiempo con el desarrollo de las dos capas restantes. Las tres capas se van desarrollando simultáneamente. Además, durante el proceso morfogénético de cada una de ellas, existen importantes interacciones tisulares, celulares y moleculares entre los diferentes componentes de cada capa, y de los componentes de las tres capas entre sí, de tal modo que los procesos que ocurren en una determinada capa embrionaria repercuten en el desarrollo de las demás. Teniendo en cuenta estas características, plantearemos a continuación, de forma individual, el desarrollo de cada una de las tres capas (Lopez-Sanchez et al., 2005).

## ECTODERMO

El ectodermo determina la capa más externa (superficial) del embrión (Figura 2). Por ello, formará parte de las paredes que constituyen el espacio que rodea al embrión: el saco amniótico. En efecto, de los límites periféricos del ectodermo

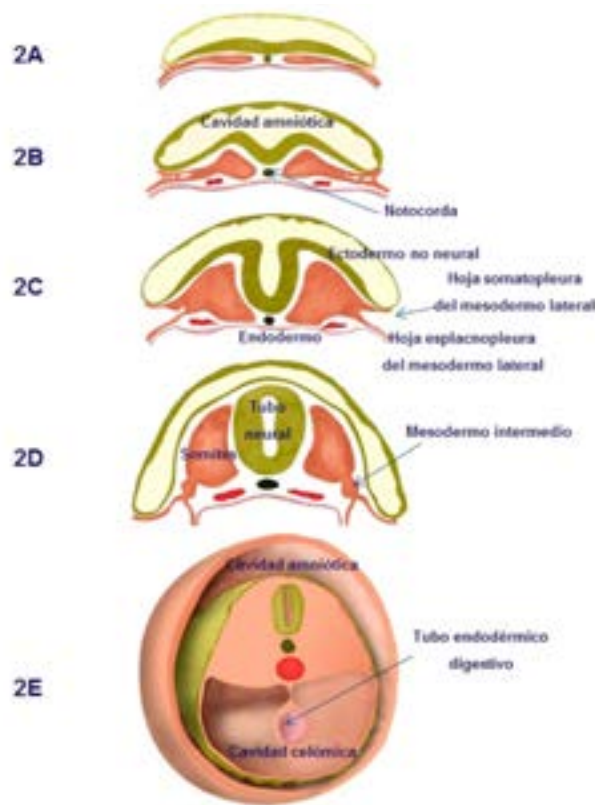


Figura 2. Secuencia de dibujos ilustrando los cambios morfogénéticos característicos de cada una de las capas embrionarias, ilustrando también el proceso de flexión lateral que da lugar al cierre del cuerpo embrionario y adquisición progresiva de su característica tridimensional.

se diferencian un grupo de células, los amniocitos, que continuándose desde el ectodermo se disponen cerrando la cavidad, en cuyo interior queda coleccionado el líquido amniótico.

Las células ectodérmicas muestran a continuación dos zonas bien definidas: una banda longitudinal, central, desde el polo embrionario craneal hasta el polo caudal, el ectodermo neural, así denominado por contener las células que darán lugar a la formación del sistema nervioso, y el resto de la superficie ectodérmica, el ectodermo no-neural, que dará lugar fundamentalmente a la capa de células cutáneas más superficiales, la epidermis.

## MESODERMO

Se trata de la capa que muestra los cambios morfogénéticos más llamativos, dando lugar a un gran número de órganos y aparatos.

Aunque todas las estructuras del mesodermo se desarrollarán

simultáneamente en el tiempo, analizaremos en primer lugar el componente mesodérmico situado en el eje longitudinal del embrión: la notocorda. Originada a partir de la migración rostro-caudal de las células epiblasticas más craneales del embrión, la notocorda se extenderá a lo largo de todo el embrión, a excepción de la zona más rostral, donde se lo impide la presencia de la placa precordial. La notocorda tendrá un papel fundamental en los procesos de inducción neural, sobre la capa ectodérmica suprayacente. De este modo, el ectodermo neural es la región ectodérmica longitudinal que está en íntima relación con la posición longitudinal de la notocorda. Experimentos clásicos en embriones de pollo han puesto de manifiesto que la extirpación de la notocorda conduce a una ausencia de diferenciación del ectodermo neural; y viceversa, la implantación experimental de una segunda notocorda de un embrión donante induce la diferenciación de dos regiones ectodérmicas neurales.

En el curso del desarrollo la notocorda se va fragmentando y regresando, de tal modo que en el organismo adulto sólo quedan unas pequeñas reminiscencias que constituyen el núcleo pulposo de los discos intervertebrales de la columna vertebral (que con frecuencia se desplazan de su localización habitual, ocasionando las hernias discales).

El segundo componente de esta capa, el mesodermo propiamente dicho, localizado a ambos lados de la notocorda, muestra un llamativo proceso morfogénético, basado en la división, de medial a lateral, en tres diferentes sectores: el mesodermo para-axial, en relación con la notocorda, el mesodermo intermedio y el mesodermo lateral.

El mesodermo para-axial se caracteriza por su división progresiva en sentido céfalo-caudal, estableciendo la presencia de pares de acúmulos celulares localizados a cada lado de la notocorda, de este modo se constituyen los pares de somites. Cuanto mayor es el número de pares de somites, más avanzado es el estadio de desarrollo embrionario, considerándose pues este dato como uno de los principales criterios para determinar la edad del embrión. Los somites están sometidos a la diferenciación de sus células, determinándose la presencia de tres líneas de diferenciación celular: dermatomo, esclerotomo y miotomo. El dermatomo es el componente de los somites que se relacionará íntimamente con el ectodermo (formador de la epidermis) y se diferenciará para dar lugar a la dermis de la piel. El esclerotomo dará lugar a la formación de estructuras cartilaginosas y óseas, fundamentalmente las costillas y las vértebras del raquis. El miotomo es el componente celular destinado a la formación de las estructuras musculares. Es de especial relevancia el dato biológico del desarrollo basado en que estos procesos tienen lugar en íntima relación con la notocorda, por ello la columna vertebral se inicia a nivel cervical y no a nivel craneal, ya que la notocorda no alcanza los niveles más rostrales, debido a la presencia de la placa precordial, anteriormente mencionada.



El mesodermo intermedio también se denomina, globalmente, nefrotomo, ya que estos cordones longitudinales, a cada lado del embrión, estarán implicados fundamentalmente en el desarrollo de los riñones y sectores más proximales de las vías urinarias.

El tercer componente, el mesodermo lateral, se caracteriza por la formación de láminas celulares que rápidamente se dividen en dos capas, una superficial, en relación con el ectodermo, la hoja somatopleura del mesodermo lateral, y otra profunda, en relación con el endodermo, que constituye la hoja esplancopleura del mesodermo lateral. Cada hoja de mesodermo lateral se fusionará con la del lado opuesto a nivel de la línea media del embrión, ya que éste se va plegando en sentido látero-medial formando el cuerpo embrionario. De este modo se constituye la cavidad celómica, que en el organismo adulto determinará la formación de las serosas (pericárdica, pleural y peritoneal).

El mesodermo es un buen ejemplo de la especificación del destino durante el proceso de gastrulación (Lopez-Sanchez et al., 2009). Experimentos realizados por nuestro grupo, han puesto de manifiesto, mediante trasplantes de segmentos de la línea primitiva entre embriones de pollo y codorniz, que las células que migran a través de esta estructura adquieren sus compromisos de diferenciación en función del estadio del desarrollo. Células presomíticas de la línea primitiva pueden ser destinadas a otras localizaciones si son trasplantadas a segmentos de la línea primitiva que son prospectivos de otros órganos, por ejemplo el corazón (Figura 3).

## ENDODERMO

Se trata de la capa embrionaria más profunda, en íntima relación con el saco vitelino. Es la que muestra los cambios morfogénéticos menos llamativos, adoptando una actitud aparentemente pasiva durante el desarrollo inicial, ya que se limita a seguir el proceso de incurvación embrionaria, dando lugar a la constitución del tubo endodérmico, que recorre el embrión longitudinalmente desde la boca primitiva (estomodeo)

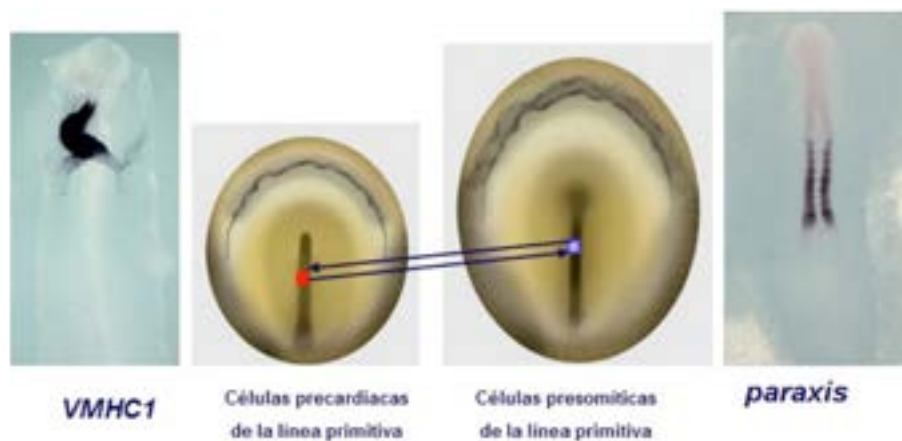


Figura 3. Procedimiento experimental mediante el cual realizamos trasplantes de sectores de la línea primitiva. El trasplante de células presomíticas de la línea primitiva a zonas precardiacas da lugar a que las células presomíticas formen corazón, y expresen el gen específico VMHC1. Y viceversa, el trasplante de células precardiacas de la línea primitiva a zonas presomíticas da lugar a que las células precardiacas formen somites, y expresen el gen específico paraxis.

hasta el ano (membrana cloacal). Las células del endodermo constituirán fundamentalmente las estructuras del tubo digestivo, en referencia fundamentalmente a la mucosa digestiva (Figura 2E).

## COMIENZO DE LA ORGANOGÉNESIS: SISTEMA NERVIOSO Y SISTEMA CARDIOVASCULAR.

Aunque todas las estructuras referidas presentan un desarrollo simultáneo a lo largo de las diferentes fases del desarrollo inicial referido, es evidente que algunos órganos y aparatos muestran indicios de diferenciación antes que otros. Es el caso del sistema nervioso y sistema cardiovascular.

## SISTEMA NERVIOSO

Uno de los cambios morfogénéticos más precoces que pueden observarse a nivel del desarrollo es la diferenciación del ectodermo neural. Alrededor de la tercera semana de gestación se inicia el desarrollo del sistema nervioso. Este proceso inicial se denomina neurulación, que incluye la formación de la placa neural y los pliegues neurales, y su cierre para formar el tubo neural, aproximadamente hasta la cuarta semana del desarrollo (Figura 2). La placa neural se constituye mediante un engrosamiento del ectodermo que se relaciona en



Figura 4. Visión craneal, desde el saco amniótico, mostrando la formación del tubo neural, desde la zona central del embrión hacia los polos cefálico y caudal del mismo.

principio con el nódulo de Hensen y posteriormente con el mesodermo axial, la notocorda, prolongándose en sentido cráneo-caudal (García-Martínez et al., 1993). Posteriormente, la placa neural se invagina a lo largo de su eje longitudinal para formar el canal neural y seguidamente el surco neural, con los pliegues neurales a cada lado. Los



pliegues neurales se aproximan tanto que el surco neural llega a cerrarse progresivamente, constituyendo el tubo neural (Figura 2). Este proceso de cierre del tubo neural se inicia en la zona central del embrión, extendiéndose progresivamente hacia los extremos rostral y caudal, y cerrándose finalmente los orificios de los extremos, los neuroporos, craneal y caudal (Figura 4).

El tubo neural dará origen al sistema nervioso central: encéfalo y médula espinal (García-Martínez et al., 1993). Asimismo, la luz del tubo neural, el conducto neural, formará las cavidades ventriculares y el conducto endimario, respectivamente. De la región más dorsal del tubo neural se originan las células de la cresta neural que darán lugar a numerosos tipos celulares diferenciados: 1) las células neuronales y gliales de los sistemas nerviosos sensoriales, simpático y parasimpático; 2) las células productoras de adrenalina de la glándula suprarrenal; 3) las células de la epidermis que contienen pigmentos; 4) muchos de los componentes de los tejidos conectivos y esqueléticos de la cabeza.

Cuando está finalizando el cierre del neuroporo rostral, el segmento de tubo neural más craneal (rostral al nivel del cuarto par de somites), tiene lugar el desarrollo del encéfalo. Inicialmente, este sector del tubo determina un proceso morfogenético caracterizado por la formación de las tres vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo (cerebro anterior o rostral), mesencéfalo (cerebro medio) y rombencéfalo (cerebro caudal). Posteriormente el prosencéfalo se divide en dos vesículas, telencéfalo y diencéfalo, en tanto que el rombencéfalo se divide en metencéfalo y mielencéfalo, constituyéndose de este modo las cinco vesículas cerebrales secundarias (Figura 5).

Estructuralmente, la pared del tubo neural se compone de neuroepitelio cilíndrico pseudoestratificado, grueso, que evoluciona según se configure la estructura histológica. A nivel medular, los cuerpos o somas neuronales (sustancia gris) se localizarán en la zona central, zona ventricular,

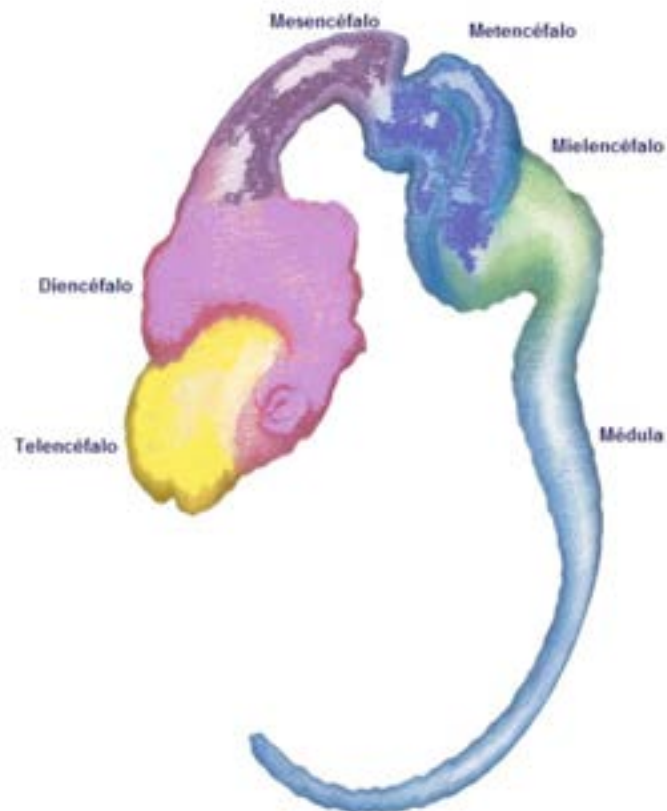


Figura 5. Establecimiento de la fase característica de cinco vesículas para la constitución del sector encefálico a nivel del sistema nervioso central.

mientras que de modo gradual, la zona periférica, zona marginal, da origen a la sustancia blanca, a medida que sobre ella crecen las prolongaciones desde los somas neuronales de la médula espinal, encéfalo y ganglios raquídeos; sin embargo, a nivel encefálico, la sustancia gris adopta una disposición preferentemente superficial (corteza cerebral y cerebelosa) y la sustancia blanca una distribución más profunda.

### SISTEMA CARDIOVASCULAR

El sistema circulatorio es la primera unidad funcional en constituirse, siendo el corazón el primer órgano que comienza a funcionar (aproximadamente en la 3ª semana), para poder suministrar los requerimientos nutricionales y de oxígeno, que no pueden ser satisfechos por difusión cuando el embrión comienza a ser más complejo (Kirby, 2007). Se desarrolla inicialmente como una estructura tubular sencilla, hasta constituir un órgano maduro, tetracameral, con un alto grado de complejidad (González-Sánchez y Bader, 1990; Harvey, 2002; Brand, 2003).

Desde el punto de vista experimental, hemos puesto de manifiesto (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; Schoenwolf y García-Martínez, 1995), en embriones de aves, que las células precardiacas son identificables, incluso antes de la gastrulación, a nivel de la mitad rostral del ectodermo (epiblasto), laterales a la línea primitiva e inmediatamente caudales al nódulo de Hensen (Figura 6).

Al comienzo de la fase de gastrulación, las células precardiacas se dirigen hacia la línea media del embrión, se invaginan a través de zonas determinadas de la línea primitiva, situadas justo caudalmente al nódulo de Hensen, y migran rostrolateralmente en distribución bilateral, a ambos lados del nódulo de Hensen, hasta situarse a nivel de las áreas de mesodermo precardiaco, que van a contribuir a la formación del endocardio y del miocardio. Este proceso abarca en el embrión humano aproximadamente hasta el día 18 del desarrollo (Rawles, 1943; Rosenquist y DeHaan, 1966; Rosenquist, 1970). El mesodermo precardiaco establece una estrecha relación con el endodermo

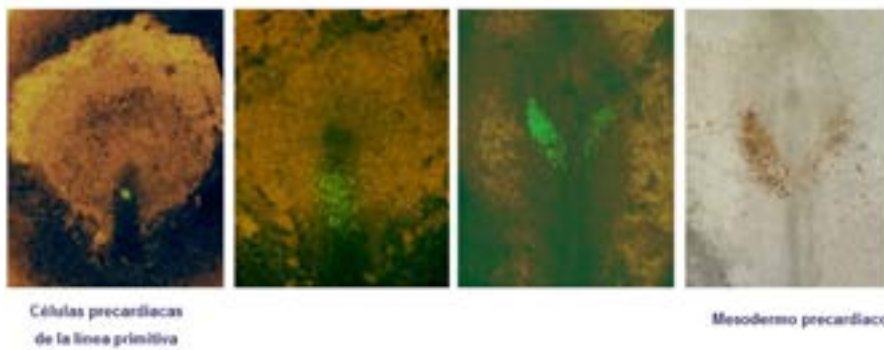


Figura 6. Embrión experimental sometido al marcaje de las células precardiacas de la línea primitiva con sustancias fluorescentes. La secuencia fotográfica pone de manifiesto la migración celular hacia el mesodermo precardiaco, detectadas posteriormente con anticuerpos frente a las células marcadas.

anterior, que ha sido implicado en el proceso de diferenciación del corazón embrionario (Stalberg y DeHaan, 1969; Fishman y Chien, 1997; Franco et al., 2002).

El mesodermo precardiaco aún indiferenciado, que se extiende a lo largo del eje antero-posterior a cada lado del embrión, sufre posteriormente un proceso de epitelialización y diferenciación que dará lugar a la

formación de una estructura par, los tubos endocárdicos primitivos (Figura 7), teniendo lugar en el día 20 del desarrollo humano (Schultheiss et al., 1995).

Debido al cierre de la placa neural y también a la elongación de las vesículas encefálicas, el sistema nervioso central crece y se expande sobre la región cardiogénica central y la futura cavidad pericárdica. En respuesta a

este crecimiento del sistema nervioso y a la flexión cefalocaudal del embrión, y simultáneamente a estos eventos, los tubos endocárdicos son desplazados hacia la región cervical para posteriormente alcanzar su ubicación definitiva a nivel torácico. En este proceso los tubos se acercan y se fusionan en la línea media del embrión. La fusión comienza en el extremo cefálico de los tubos y se extiende en dirección caudal, de tal modo que se forma un tubo cardíaco único, denominado tubo cardíaco primitivo, con capacidad contráctil, y estructuralmente constituido por el endocardio, por la pared muscular o miocardio, y por el epicardio, que recubre el exterior del tubo.

En el curso del desarrollo el tubo cardíaco primitivo se incurva hacia la derecha y da lugar a la formación de una estructura denominada asa cardíaca, inicialmente con forma de "C", y al progresar el plegamiento del cuerpo embrionario adquiere forma de "S" (Manasek et al., 1972; Lin y Taber, 1994; Levin, 1997, 2005; Levin et al., 1997; Manner, 2000; Voronov et al., 2004; Ramasubramanian et al., 2006). Este desplazamiento del tubo cardíaco primitivo constituye una de las primeras señales de asimetría izquierda-derecha en el embrión (Figura 8).

Simultáneamente a la formación del asa cardíaca se produce la segmentación o regionalización del corazón embrionario (Larry et al., 1995), de tal forma que se constituyen y diferencian las distintas partes del corazón: seno venoso en el polo caudal, atrio o aurícula y ventrículo primitivos, y bulbus cordis, región tronco-conal, o polo arterial, en el extremo cefálico. La septación o tabicación consiste en un proceso basado en la formación del septum atrial y septum ventricular, necesarios para la separación de la doble circulación del corazón, así como la formación del aparato valvular, que se localizará en la región atrioventricular y tracto de salida cardíaco (Kramer, 1942; Kirby, 2007).

En el interior del sector atrial se forma inicialmente el *septum primum* y posteriormente el *septum secundum*. El *septum primum*, de aspecto falciforme,

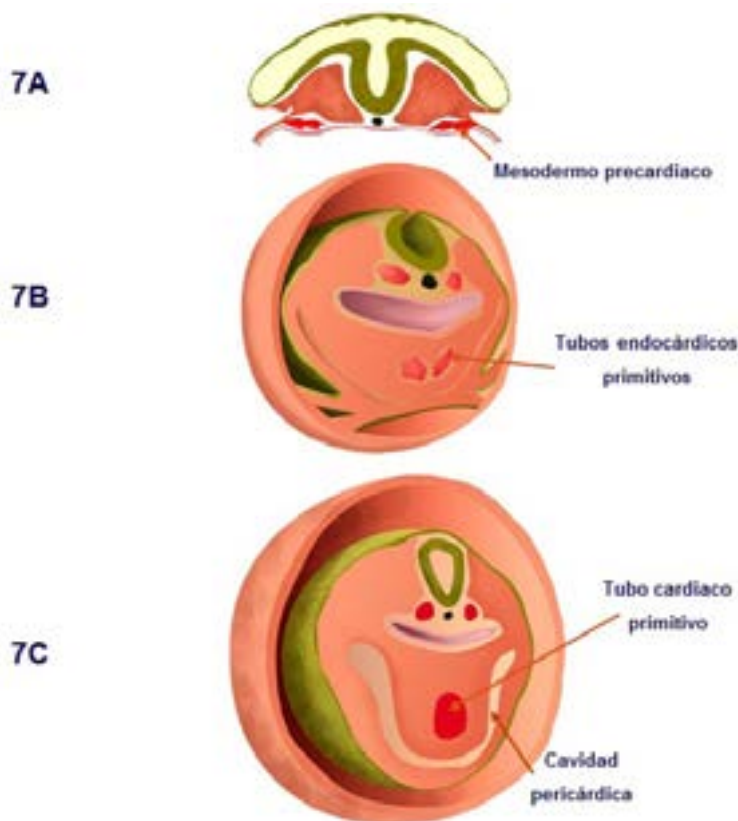


Figura 7. Secuencia que ilustra la formación de ambos tubos endocárdicos primitivos a partir del mesodermo precardiaco. Posteriormente se fusionan para constituir el tubo cardíaco primitivo, ventral a la primitiva faringe.

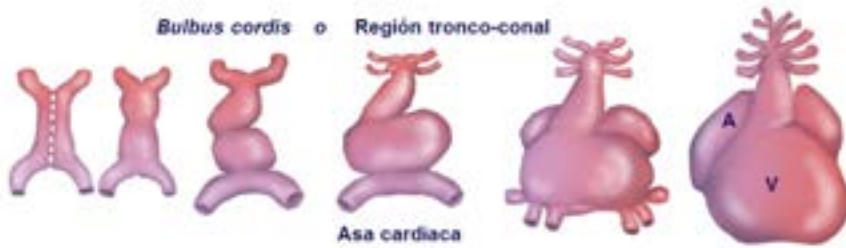


Figura 8. Proceso morfológico que caracteriza la formación del corazón tetracameral. Desde la fusión de ambos tubos endocárdicos primitivos se establece el tubo cardíaco primitivo, que se incurva y forma el asa cardíaca. Posteriormente se divide en sectores (A: atrial, V: ventricular) y finaliza adquiriendo la forma característica del corazón adulto.

desciende desde la pared superior de la aurícula primitiva, y sufre un proceso de perforación, formando el *ostium primum*, que será cerrado parcialmente por el desarrollo del *septum secundum*, a la derecha de éste. Permite el paso de sangre de la aurícula derecha a la izquierda, a través del *foramen oval* del *septum secundum*, que se cerrará totalmente en el nacimiento (Moorman y Christoffels, 2003).

El tabique o *septum* interventricular se forma por la organización de dos estructuras: la porción muscular y la porción membranosa. La porción muscular se origina de la capa miocárdica, en el ápice del ventrículo primitivo, permitiendo la presencia del foramen interventricular, comunicando ambos ventrículos (Escribano et al., 2006). La porción membranosa, responsable del cierre del *foramen* interventricular, se desarrolla a partir de las crestas tronco-conales, constituidas por células que migran desde la cresta neural, recubiertas de células de origen endocárdico (Akiyama et al., 2004).

En la división del tracto de salida cardíaco tiene lugar la separación de la arteria pulmonar y la aorta, por la presencia de las crestas troncoconales, que contribuirán además a la formación de las válvulas semilunares, aórtica y pulmonar.

## SEÑALIZACIÓN CELULAR

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel crucial que juegan los factores moleculares en el proceso de diferenciación y morfogénesis durante el desarrollo embrionario. Numerosos trabajos previos demuestran que la expresión específica de diferentes

genes es responsable de la codificación y síntesis de proteínas con capacidad de señalizar y transmitir información entre células, constituyendo las bases de la diferenciación celular. Además, es bien conocido que un determinado gen puede actuar en diferentes fases del desarrollo, y en diferentes grupos celulares. Una coordinación precisa entre moléculas inductoras, moléculas represoras y mecanismos de control de ambas dan lugar al establecimiento de rutas de señalización responsables de un determinado proceso embrionario, alcanzándose recientemente un elevado conocimiento científico de las mismas.

Los mecanismos moleculares que actúan en el desarrollo están basados fundamentalmente en dos aspectos: i) en la regulación génica por factores de transcripción, que son genes que controlan la expresión de otros genes, y ii) mediante morfógenos y señales intercelulares, mecanismo basado en la comunicación de las células a través de un receptor de la superficie celular y por la molécula (denominada ligando) que se une al mismo, permitiendo así a los receptores transmitir sus señales a procesos intracelulares.

El desarrollo del sistema nervioso constituye uno de los mejores ejemplos de la participación de la señalización molecular como base de la biología del desarrollo (Figura 9).

Una primera evidencia viene determinada por la participación de los BMPs (*Bone morphogenetic proteins*, proteínas morfogenéticas de hueso). BMP4: La proteína morfogenética ósea está codificada por el gen *Bmp4*. En ausencia de actividad de *Bmp4* el ectodermo dorsal forma tejido neural por defecto. Esta proteína es inhibida por los agentes Anti-BMP (noggina, follistatina y cordina) producidos por la notocorda. Este conjunto de interacciones moleculares hace que las células ectodérmicas situadas sobre la notocorda queden comprometidas para su transformación en tejido neural, en lo que sólo representa el primer paso en la formación del sistema nervioso.

*Otx2*, *Gbx2* y *Hox* son un grupo de genes que regulan la distribución regional, la subdivisión del sistema nervioso central en regiones rostro-caudales. En el desarrollo de la región del prosencéfalo y la del mesencéfalo juegan un papel determinante la expresión del gen *Otx2*. En el romboencéfalo estarían implicados los genes *Gbx2* y *Hox*. La regionalización del tubo neural es particularmente evidente en la región del cerebro posterior con los genes *Hox*, expresados en un patrón bien definido.

La expresión de diferentes genes durante el desarrollo del corazón (Olson y Srivastava, 2006; Piedra et al., 2002) ha sido una de las principales vías de conocimiento, a nivel molecular,

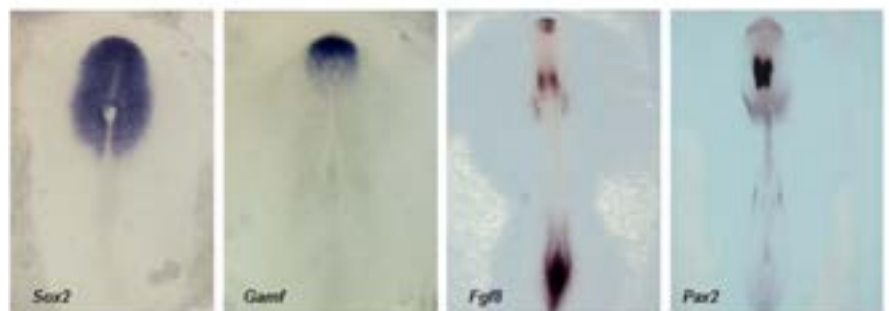


Figura 9. Colección de embriones de nuestro laboratorio, tratados mediante técnicas de hibridación in situ, que ponen de manifiesto la expresión de diferentes genes específicos, característicos de la diferenciación de las estructuras del sistema nervioso.



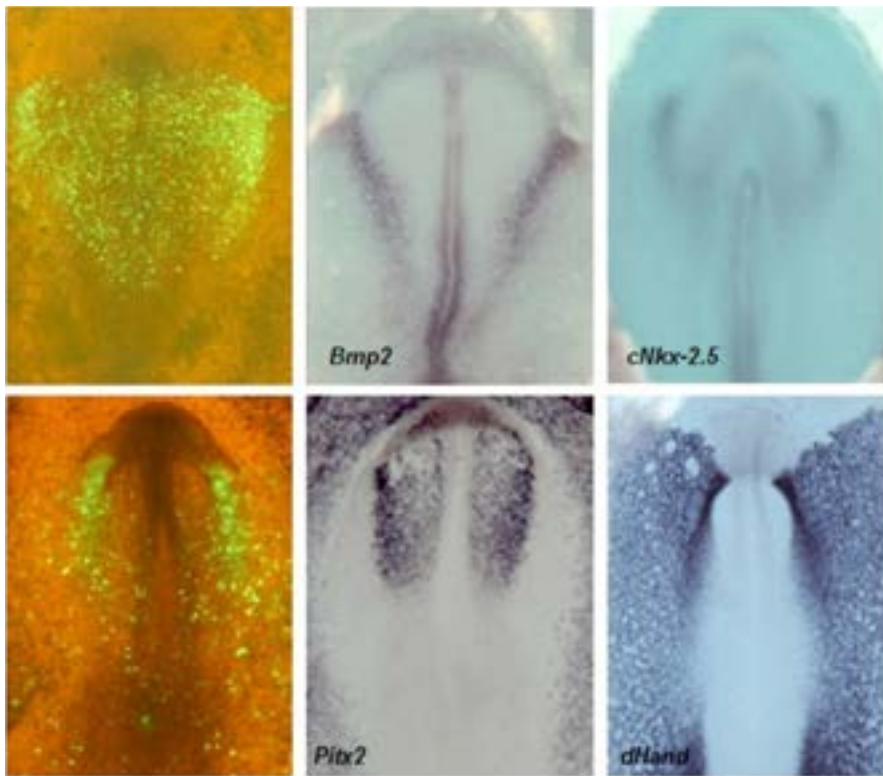


Figura 10. Colección de embriones de nuestro laboratorio, tratados mediante técnicas de hibridación *in situ*, que ponen de manifiesto la expresión de diferentes genes específicos, característicos de la diferenciación del corazón.

para la comprensión de los complejos acontecimientos que caracterizan los procesos de cardiogénesis y morfogénesis cardíaca (Figura 10).

aplicación de microesferas de heparina, cargadas con determinados factores de crecimiento, hemos demostrado la capacidad de inducción de células no precardiacas hacia la diferenciación en

La primera manifestación de la diferenciación de células del mesodermo esplácnico hacia la formación de células cardíacas viene determinada por la expresión del factor de transcripción *Nkx-2.5*, como consecuencia de la inducción de miembros de las familias *Fgf* (*Fibroblast growth factors*, factores de crecimiento fibroblástico) y *Bmp* (*Bone morphogenetic protein*, proteínas morfogenéticas de hueso), que se expresan en el endodermo adyacente al mesodermo precardiaco, comprometiendo a las células de estas áreas en la vía de diferenciación de células cardíacas (Gitler et al., 2003).

En nuestro laboratorio (Lopez-Sanchez et al., 2002, 2004; Lopez-Sanchez y Garcia-Martinez, 2011) hemos puesto de manifiesto de forma experimental la relevancia de los factores de crecimiento en la inducción cardíaca. Mediante la

células específicas del corazón (Figura 11).

Una de las fases fundamentales de la morfogénesis cardíaca viene definida por la formación del asa cardíaca, constituyendo la primera estructura asimétrica que aparece en el embrión.

La base molecular inicial de esta diferencia izquierda-derecha vendría definida por la expresión de genes de asimetría controlados por *Pitx2*, y de los factores de transcripción cardíacos *Nkx-2.5*, *Mef2*, *eHand* y *dHand* (Eisenberg y Bader, 1996; Hjalt et al., 2000; Linask et al., 2002; Dong et al., 2006). La primera indicación molecular del desarrollo asimétrico del tubo cardíaco es la expresión de *eHand* a nivel del lado izquierdo del tubo cardíaco, mientras que *dHand* se expresa principalmente en el primordio del ventrículo derecho, tal como se ha puesto de manifiesto en animales de experimentación (pollo y ratón), y la eliminación experimental de estos genes origina un bloqueo de la formación del asa. En la especie humana estarían implicados (Thomas et al., 1998) los genes *Hand1* (homólogo de *eHand*) y *Hand2* (homólogo del *dHand*).

Recientemente han sido implicados como factores fundamentales en

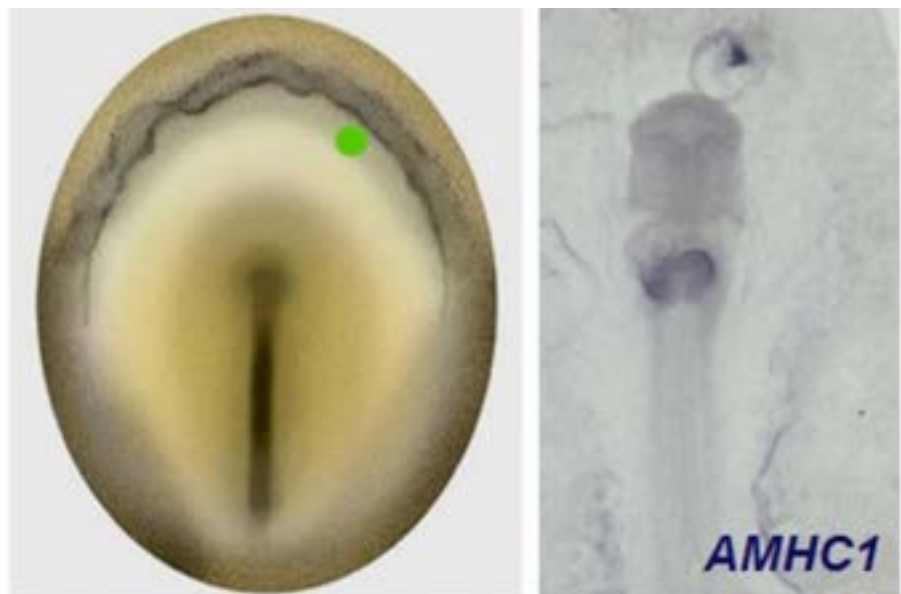


Figura 11. Embrión experimental sometido a la administración ectópica de FGF2 mediante la aplicación de una microesfera impregnada (esquema). Nótese en la micrografía del embrión experimental la expresión del gen específico de corazón, *AMHC1*, a nivel del corazón y a nivel del tejido ectópico inducido por FGF2.



el desarrollo los microRNAs. Son secuencias cortas de moléculas de RNA, de 20-24 nucleótidos de longitud, que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión de genes. Actuarían inhibiendo la traslación del mRNA y síntesis de la proteína, o degradando el mRNA. Regulan una gran variedad de funciones del proceso de desarrollo y fisiológicas, tales como diferenciación de células madre, neurogénesis, hematopoyesis, reacción inmune o metabolismo, y han sido asociados a diversas patologías: cáncer, enfermedades autoinmunes, inflamatorias y neurodegenerativas (Fazi y Nervi, 2008; Scalbert y Bril, 2008; Sucharov et al., 2008; Thum et al., 2008; Cordes et al., 2010).

## SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA GASTRULACIÓN

La gastrulación no es un proceso exclusivo de vertebrados y todos los animales tienen en una u otra medida una fase del desarrollo en la cual las células originadas durante las divisiones rápidas y sincrónicas del proceso de segmentación (una traducción más exacta del inglés sería partición: *cleavage*) adquieren una serie de características que determinan el paso de estructuras más o menos esféricas a organismos con capas, regiones, órganos y células especializadas. Este cambio se debe principalmente a que las células, una vez que adquieren un tamaño crítico (mediante reducción del gran cigoto), comienzan un proceso de migración y especificación que logra la formación de los organismos tal y como los conocemos en su fase permanente o adulta.

Este establecimiento del plan del organismo tiene en común el ingreso de células superficiales (por ejemplo el epiblasto en vertebrados) a capas más profundas, mediante desplazamientos celulares de gran envergadura para el tamaño del embrión. Desde el erizo de mar a la ballena, esta migración de células se produce a través y a la vez está coordinada por regiones específicas del embrión que actúan como centros organizadores para que, según las células pasan por estas zonas, vayan asumiendo el destino final que tendrán en el organismo, no solamente

la posición que habrán de ocupar, sino también el tipo de célula que originarán.

Así, el blastoporo en invertebrados, el labio dorsal en anfibios y la línea primitiva con el nódulo en su zona más anterior actúan como verdaderos controladores del proceso de migración y consiguen que según las células pasan por estos centros, adquieran una etiqueta muy definida para la construcción final del organismo de que se trate. A modo de comparación gráfica (y ya que se trata de un artículo de formación), es como si en un reloj de arena según pasan los granos entre un compartimento y otro adquiriesen la información suficiente para formar un verdadero castillo de arena en la parte inferior.

Esta remodelación y especificación a partir de células pluripotentes (el epiblasto) para conseguir una estructura similar al organismo definitivo, y que en la especie humana ocurre aproximadamente a las dos semanas de la fecundación, es considerada también por muchos investigadores (y establecido en algunas creencias como el judaísmo) como el comienzo real de un nuevo organismo (nuevo ser), ya que es cuando la singularidad propia y no retornable se origina gracias a los complejos mecanismos de la gastrulación, que pueden llegar a ser tan únicos como el propio genoma de cada individuo. Esta apreciación, y el comentario, puede quedar fuera del enfoque de este artículo, pero podría tener un gran significado ético, y por lo tanto legislativo, que pensamos debería ser conocido por todos los embriólogos clínicos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo prestado por los miembros de IERA (Instituto Extremeño de Reproducción Asistida, Badajoz) para la confección de este artículo. Agradecemos a María Pérez y Julia Anaya, ilustradoras del CCMI *Jesús Usón*, su trabajo en la realización de los dibujos y esquemas. Este trabajo ha sido financiado, en parte, por la Junta de Extremadura (Fondo Social Europeo), Grupos Catalogados CTS005 y CCV010.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez-Miguel, I.S., Miguel-Lasobras, E.M., Martín-Romero, F.J., Domínguez-Arroyo, J.A., González-Carrera, E. (2006). Polaridad durante el desarrollo embrionario inicial. *Rev. Asoc. Est. Biol. Rep.*, 11 (2): 35-45.

Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Behringer, R.R., Rowitch, D.H., Schedl, A., Epstein, J.A., de Crombrughe, B. (2004). Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101:6502-6507.

Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev. Biol.*, 258: 1-19.

Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., Fontes, C., Hickman, L. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Rep. BioMed. Online*, 26: 477-485.

Cordes, K.R., Srivastava, D., Ivey, K.N. (2010). MicroRNAs in cardiac development. *Pediatr. Cardiol.*, 31:349-356.

Dong, F., Sun, X., Liu, W., Ai, D., Klysiak, E., Lu, M.F., Hadley, J., Antoni, L., Chen, L., Baldini, A., Francis-West, P., Martin, J.F. (2006). Pitx2 promotes development of splanchnic mesoderm-derived branchiomeric muscle. *Development*, 133: 4891-4899.

Eisenberg, C.A., Bader, D. (1996). Establishment of the mesodermal cell line QCE-6. A model system for cardiac cell differentiation. *Circ. Res.*, 78: 205-216.

Escribano, D., Arbués, J., Moreno, A., López-Sánchez, C., García-Martínez, V., Galindo, A. (2006). Pallister-Killian syndrome presenting with a complex congenital heart defect and increased nuchal translucency. *J. Ultrasound Med.*, 25: 1475-1480.

Fazi, F., Nervi, C. (2008). MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc. Res.*, 79:553-561.

Fishman, M.C., Chien, K.R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development*, 124: 2099-2117.

- Franco, D., Dominguez, J., de Castro, M., Aranega, A. (2002). Regulation of myocardial gene expression during heart development. *Rev. Esp. Cardiol.*, 55: 167-184.
- García-Martínez, V., Schoenwolf, G.C. (1992). Positional control of mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. *Dev. Dynam.*, 193: 249-256.
- García-Martínez, V., Schoenwolf, G.C. (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev. Biol.*, 159: 706-719.
- García-Martínez, V., Alvarez, I.S., Schoenwolf, G.C. (1993). Locations of the ectodermal and non-ectodermal subdivisions of the avian epiblast at stages 3 and 4 of avian gastrulation and neurulation. *J. Exp. Zool.*, 267: 431-446.
- García-Martínez, V., López-Sánchez, C., Darnell, D.K., Sosis, D., Olson, E.N., Schoenwolf, G.C. (1997). State of commitment of prospective neural plate and prospective mesoderm in late gastrula/early neurula stages of avian embryos. *Dev. Biol.*, 181: 102-115.
- Gitler, A.D., Lu, M.M., Jiang, Y.Q., Epstein, J.A., Gruber, P.J. (2003). Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. *Dev. Dynam.*, 228: 643-650.
- Gonzalez-Sanchez, A., Bader, D. (1990). In vitro analysis of cardiac progenitor cell differentiation. *Dev. Biol.*, 139: 197-209.
- Harvey, R. P. (2002). Patterning the vertebrate heart. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 544-556.
- Hatada, Y., Stern, C.D. (1994). A fate map of the epiblast of the early chick embryo. *Development*, 120: 2879-2889.
- Haunstetter, A., Izumo, S. (1998). Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 82: 1111-1129.
- Hjalt, T.A., Semina, E.V., Amendt, B.A., Murray, J.C. (2000). The Pitx2 protein in mouse development. *Dev. Dynam.*, 218: 195-200.
- Kirby, M.L. (2007). *Cardiac Development*. Oxford University Press.
- Kramer, T.C. (1942). The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the interventricular septum in the human heart. *Am. J. Anat.*, 71: 343-370.
- Larry, A.T., Lin, I-E., Clark, E.B. (1995). Mechanics of cardiac looping. *Dev. Dynam.*, 203: 42-50.
- Levin, M. (1997). Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *Bioessays*, 19: 287-296.
- Levin, M. (2005). Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech. Dev.*, 122: 3-25.
- Levin, M., Pagan, S., Roberts, D.J., Cooke, J., Kuehn, M.R., Tabin, C.J. (1997). Left-right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 189: 57-67.
- Lin, I.E., Taber, L.A. (1994). Mechanical effects of looping in the embryonic chick heart. *J. Biomech.*, 27: 311-321.
- Linask, K.K., Yu, X., Chen, Y., Han, M.D. (2002). Directionality of heart looping effects of Pitx2 misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Dev. Biol.*, 246: 407-417.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V. (2011). Molecular determinants of cardiac specification. *Cardiovasc. Res.*, 91: 185-195.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., Schoenwolf, G.C. (2001). Localization of cells of the prospective neural plate, heart and somites within the primitive streak and epiblast of avian embryos at intermediate primitive-streak stages. *Cells Tissues Org.*, 169: 334-346.
- Lopez-Sanchez, C., Climent, V., Schoenwolf, G.C., Alvarez, I.S., Garcia-Martinez, V. (2002). Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res.*, 309: 237-249.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., Lawson, A., Chapman, S.C., Schoenwolf, G.C. (2004). Rapid triple-labeling method combining in situ hybridization and double immunocytochemistry. *Dev. Dynam.*, 230: 309-315.
- Lopez-Sanchez, C., Puelles, L., Garcia-Martinez, V., Rodriguez-Gallardo, L. (2005). Morphological and molecular analysis of early developing chick require an expanded series of primitive-streak stages. *J. Morphol.*, 264: 105-116.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Masa, N., Gañán, C.M., Garcia-Martinez, V. (2009). Movements and commitment of precardiac cells of the primitive streak during cardiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 53: 1445-1455.
- Manasek, F.J., Burnside, M.B., Waterman, R.E. (1972). Myocardial cell shape change as a mechanism of embryonic heart looping. *Dev. Biol.*, 29: 349-371.
- Manner, J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat. Rec.*, 259:248-262.
- Moorman, A.F., Christoffels, V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol. Rev.*, 83:1223-1267.
- Olson, E.N., Srivastava, D. (1996). Molecular pathways controlling heart development. *Science*, 272: 671-676.
- Piedra, M.E., Ros, M.A. (2002). BMP signaling positively regulates Nodal expression during left right specification in the chick embryo. *Development*, 129:3431-3440.
- Ramasubramanian, A., Latacha, K.S., Benjamin, J.M., Voronov, D.A., Ravi, A., Taber, L.A. (2006). Computational model for early cardiac looping. *Ann. Biomed. Eng.*, 34: 1655-1669.
- Rawles, M. (1943). The heart forming areas of the early chick blastoderm. *Physiol. Zool.*, 16: 22-42.
- Rosenquist, G.C. (1970). Location and movements of cardiogenic cells in the chick embryo: the heart-forming portion of the primitive streak. *Dev. Biol.*, 22: 461-475.
- Rosenquist, G.C., DeHaan, R.L. (1966). In *Contributions to Embryology: Migration of the precardiac cells in the chick embryo:*

A radioautographic study. *Carn Contrib Embryol* 38: 111-121.

Scalbert, E., Bril, A. (2008). Implication of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8:181-188.

Schoenwolf, G.C., Garcia-Martinez, V. (1995). Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 41: 233-240.

Schoenwolf, G.C., Garcia-Martinez, V., Dias, M.S. (1992). Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. *Dev. Dynam.*, 193: 235-248.

Schultheiss, T.M., Xydas, S., Lassar, A.B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development*, 121: 4203-4214.

Selleck, M.A., Stern, C.D. (1991). Fate

mapping and cell lineage analysis of Hensen's node in the chick embryo. *Development*, 112: 615-626.

Stalsberg, H., DeHaan, R.L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 19: 128-159.

Sucharov, C., Bristow, M.R., Port, J.D. (2008). miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 45: 185-192.

Thomas, T., Yamagishi, H., Overbeek, P.A., Olson, E.N., Srivastava, D. (1998). The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness. *Dev. Biol.*, 196: 228-236.

Thum, T., Catalucci, D., Bauersachs, J. (2008). MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease.

*Cardiovasc. Res.*, 79: 562-570.

Voronov, D.A., Alford, P.W., Xu, G., Taber, L.A. (2004). The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 272: 339-350.

Xiao, J., Luo, X., Lin, H., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, N., Zhang, Y., Yang, B., Wang, Z. (2007). MicroRNA miR-133 represses HERG K<sup>+</sup> channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *J. Biol. Chem.*, 282:12363-12367.

Zamir, E.A., Srinivasan, V., Perucchio, R., Taber, L.A. (2003). Mechanical asymmetry in the embryonic chick heart during looping. *Ann. Biomed. Eng.*, 31: 1327-1336.

# EmbryoGen®

## The first medium with rhGM-CSF cytokine

- A new IVF medium for cleavage-stage embryos containing a naturally occurring cytokine
- Supports the natural mother-embryo communication
- A novel treatment option for some of the most challenged patients



origio

a CooperSurgical Company

**XVI MÁSTER DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA  
(CURSO 2013-2014)**

Preinscripción del 24 de junio al 10 de julio de 2013  
<http://www.uab.es/postgrau>  
[http://www.dexeus.com/es\\_ES/profesionales-02-0.aspx](http://www.dexeus.com/es_ES/profesionales-02-0.aspx)

**MÁSTER EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE MAMÍFEROS**

Octubre 2013 - Septiembre 2014  
<http://www.um.es/web/veterinaria/contenido/estudios/masteres/bio-tecno-mamiferos>

**ESHRE CAMPUS SYMPOSIUM - INTRODUCING NEW TECHNIQUES INTO THE LAB**

Barcelona, Spain  
4-5 October 2013  
[info@eshre.eu](mailto:info@eshre.eu)  
[www.eshre.eu](http://www.eshre.eu)

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN MEDICINA Y GENÉTICA REPRODUCTIVAS**

4 de Octubre de 2013 a 6 de Junio 2014  
Universidad Miguel Hernández  
<http://biolreproduccion.umh.es>  
[biologia.reproduccion@umh.es](mailto:biologia.reproduccion@umh.es)

**ASRM 2013**

69th Annual Meeting  
October 12-17, 2013  
Boston, Massachusetts  
<http://asrm.org/IFFS-ASRM2013>

**ASEBIR 2013**

VII Congreso Sevilla  
Centro de Convenciones Gran Sevilla  
20-22 Noviembre 2013  
<http://www.congresoasebir.es>

**ALPHA 2014**

10th Biennial Conference  
9 - 11 May 2014  
Antalya - Turkey  
[alpha2014@figur.net](mailto:alpha2014@figur.net)

**SEF 2014**

XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad  
Barcelona, 29-31 Mayo 2014  
<http://sefbarcelona2014.com>





**CONTIGO**  
ayer, hoy y siempre

[www.reprogenetics.es](http://www.reprogenetics.es)

## CLONACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS HUMANAS

El pasado 15 de mayo, la revista Cell publicó un avance on line de un estudio del equipo de Shoukhrat Mitalipov, de la Oregon Health & Science University, en el que se mostraba por primera vez la clonación de células somáticas humanas mediante la transferencia de núcleos a óvulos enucleados (la técnica con la que se consiguió en 1996 a la oveja Dolly), y la formación de blastocistos a partir de los cuales se desarrollaron cuatro líneas de células madre embrionarias que fueron capaces luego de originar diferentes tipos celulares. Este hallazgo fue logrado siguiendo los protocolos desarrollados en primates no humanos, con los que Mitalipov había conseguido ya estos resultados en macacos en 2007. En este estudio, lo lograron utilizando una línea celular de fibroblastos fetales humanos, y los resultados fueron luego replicados con una línea celular comercial de fibroblastos de piel de un síndrome de Leigh. Mitalipov afirma que su trabajo está orientado hacia la investigación en medicina regenerativa, con los objetivos fundamentales de desarrollar modelos in vitro de enfermedades, así como de conseguir la diferenciación de tejidos clonados de pacientes con enfermedades diversas, que luego podrían ser trasplantados al

mismo paciente sin el riesgo de rechazo. Dice el investigador que, aunque a nivel mediático se relacione su investigación con la posibilidad de clonar a una persona, no tiene interés alguno en la clonación reproductiva de humanos, sino más bien en la generación de células madre embrionarias para combatir la enfermedad. Sin embargo, aún existe una gran brecha entre el desarrollo de blastocistos clónicos, como fuente de dichas células madre embrionarias, en lo que sería la clonación terapéutica, y la posibilidad de transferir estos blastocistos a un útero, en una clonación reproductiva, puesto que la capacidad de generar células madre embrionarias no guarda relación con la capacidad de estos blastocistos para generar un individuo completo. Como prueba de esta diferencia, el equipo de Mitalipov lleva desde 2007, cuando consiguió la clonación de células somáticas de macaco adulto, intentado la clonación reproductiva de un macaco, sin conseguirlo hasta la fecha.

Destacamos que al hacerse público este hallazgo, el diario El País se puso en contacto con ASEBIR, a través de nuestro gabinete de prensa, y se encargó a Jorge Cuadros la atención a

los medios. Después de la publicación del descubrimiento en internet el mismo 15 de mayo ([http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/05/15/actualidad/1368628879\\_460568.html](http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/05/15/actualidad/1368628879_460568.html)), diversos medios en España y América se hicieron eco de la noticia. En prensa escrita ([http://www.elcolombiano.com/bancoconocimiento/p/paso\\_gigante\\_de\\_la\\_ciencia\\_hacia\\_la\\_clonacion\\_de\\_organos\\_humanos/paso\\_gigante\\_de\\_la\\_ciencia\\_hacia\\_la\\_clonacion\\_de\\_organos\\_humanos.asp](http://www.elcolombiano.com/bancoconocimiento/p/paso_gigante_de_la_ciencia_hacia_la_clonacion_de_organos_humanos/paso_gigante_de_la_ciencia_hacia_la_clonacion_de_organos_humanos.asp); [http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/05/16/actualidad/1368729583\\_418888.html](http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/05/16/actualidad/1368729583_418888.html)), radio (<http://esradio.libertaddigital.com/fonoteca/2013-05-16/las-tres-novedades-se-abre-la-puerta-a-la-clonacion-terapeutica-58867.html>; Radio Inter; Radio Cadena Nacional FM de Colombia) y televisión (<http://www.lasexta.com/videos/completos-noticias1/2013-mayo-16-2013051600020.html>; NTN 24 de Colombia, que emite para Latinoamérica y EEUU) citaron a "Jorge Cuadros, miembro de la Junta Directiva de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción", haciendo palpable la presencia de nuestra asociación como referencia a nivel social en asuntos científicos.

## SOBRE CONTARLE AL NIÑO SUS ORÍGENES GENÉTICOS

El Grupo de Interés de Psicología (GIP) de la Sociedad Española de Fertilidad ha hecho público un documento de consenso, aprobado por unanimidad, en relación con la necesidad de ofrecer a las parejas información sobre las ventajas de revelar al niño sus orígenes genéticos en la donación de gametos.

Giuliana Baccino, coordinadora del GIP, nos ha comentado la importancia de haber alcanzado por primera vez este consenso, gracias al cual se aconseja a los profesionales de la psicología, cuyo trabajo está relacionado con las parejas que se someten a procedimientos de reproducción asistida, a hablar con

sus pacientes sobre las ventajas de la revelación de sus orígenes a los niños procedentes de donación de gametos, respetando siempre las decisiones de cada padre y madre sobre si finalmente deciden contarle o no.

## Global Total™ suplementado con Albúmina enriquecida con $\alpha$ y $\beta$ Globulinas

“En general, recomendamos que el embrión deberá cambiarse a medio nuevo global Total cada 48 horas. Sin embargo, es posible mantener el embrión en la misma gota o largos volúmenes de medio, durante 4 días o más, dependiendo de la calidad del aire y las condiciones medioambientales en el laboratorio y en el Incubador”

(ver Reed et al., 209;2010)

Reference: Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL (2009) Continuous uninterrupted single médium culture without médium renewal versus sequencial media cultura: a sibling embryo study. Fertil Steril 92,1783-6

**Medio único con más de 30 publicaciones certificadas, en sus más de 10 años en el mercado.**



**LifeGuard™**  
Aceite mineral de alta viscosidad



**Global Total™**  
Fertilización



**Global Total™**  
Hepes



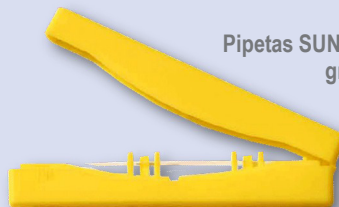
**Sistema S3 para la Vitrificación de Blastocistos Humanos:**

- No contiene DMSO
- Glicerol y Etileno Glicol, como Crioprotectores. Global w/ Hepes, como medio base
- Sistema de sellado cerrado, con pajuelas convencionales

CCD - Aguja OPS de punción de ovocitos



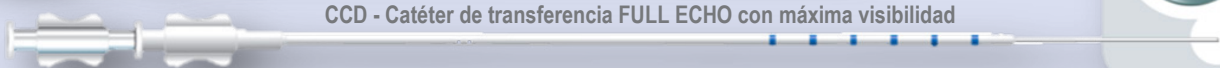
Pipetas SUNLIGHT USA para ICSI en todas las graduaciones y modelos



CCD - Catéter de transferencia PEARL TIP con esfera distal



CCD - Catéter de transferencia FULL ECHO con máxima visibilidad



Cross section view:  
2 echogenic lines included  
in the transparent catheter wall  
(Patented technology)



MATERIAL CONSUMIBLE

**Y TODO EL EQUIPAMIENTO NECESARIO PARA EL LABORATORIO FIV**



## INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES. NORMAS DE PUBLICACIÓN

La revista ASEBIR es una publicación del ámbito de la Biología de la Reproducción abierta a considerar cuantos trabajos afines a esta área de conocimiento puedan adaptarse a uno de los siguientes apartados: Actualidad, Aula Joven y Debate. Además, la revista ASEBIR da cabida a las novedades en nuestro campo en las secciones de Agenda y Noticias.

La revista ASEBIR se publica semestralmente por lo que es indispensable que los escritos sean enviados:

- Antes del 31 de Marzo para el primer número del año (Junio)
- Antes del 30 de Septiembre para el segundo número del año (Diciembre).

### MANUSCRITOS:

Todos los trabajos remitidos deberán ser inéditos y se mandarán por correo electrónico a la dirección [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com). Será necesaria una copia del artículo en formato PDF y una copia en Word, así como un documento de presentación en el cual se solicite su valoración y se indique la sección donde se desea su publicación. En este documento se hará constar que el trabajo no ha sido publicado previamente y que todos los autores están de acuerdo en su contenido y ceden los derechos de su publicación a ASEBIR. Para la reproducción de material ya editado es necesaria la autorización expresa de los propietarios del copyright. El Comité Editorial considerará la publicación de artículos enviados en inglés.

Para artículos originales y temas de actualización se sugiere una extensión no superior a las trece hojas DIN A4 a 30 líneas, con no más de seis figuras y seis tablas.

Las figuras, imágenes y tablas se deberán incluir en el documento DOC y mandar a la secretaría en formato jpg.

En la primera página de todos los trabajos se indicará, en el siguiente

orden: título en castellano; título en inglés; nombre y un apellido de cada uno de los autores y su centro de trabajo, y correo electrónico del primer autor. En la segunda página se incluirá un resumen y las palabras clave (ambos en castellano e inglés). Los autores se asegurarán de que las palabras clave, tanto en inglés como en español, se encuentren en los tesauros correspondientes del MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) y de la base de datos de BIREME (enlace "Consulta al DeCS" en <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>), respectivamente.

La estructura de los manuscritos preferentemente deberá organizarse en los apartados de Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias bibliográficas, Tablas y Gráficas. Las tablas se numerarán con números romanos y las figuras con números arábigos. Los pies de figura deberán estar listados en una hoja aparte y cada figura llevará escrita su numeración.

Las citas bibliográficas deben ser directas, consignándose en el texto el nombre del autor o de los dos autores y el año (Ej.: Smith, 1993 o bien Smith and Michigan, 1997) y si son más de dos autores consignándose el primero seguido de "et al.," (Ej.: Smith et al., 1998). Para agrupar varias citas se encadenarán con ";" (Ej.: Smith and Michigan, 1997; Smith et al., 1998).

Las referencias bibliográficas se presentarán en la sección correspondiente por orden alfabético siguiendo las normas del International Committee of Medical Journal Editors 5th edition (dichas normas se pueden consultar en JAMA 1997; 277:927-934). Los nombres de las revistas se abreviarán de acuerdo con el estilo usado en el Index Medicus (que se puede consultar en la List of Journals Indexed que se incluye todos los años en el número de enero). A continuación se dan un ejemplo de formato de citas bibliográficas:

A) Artículo de revista con menos

de 6 autores: Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* 1993; 59:418-423.

B) Artículo de revista con más de 6 autores: Marrama P, Baraghini GF, Carani C, Celani MF, Giovenco P, Grandi F, et al. Further studies on the effect of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligoasthenozoospermia. *Andrologia* 1985; 17:612-616.

C) Libro completo: Colson JH, Armour WJ. *Spermatogénesis*. 2º ed. Londres: Delmar Publishers; 1996.

D) Capítulo de libro: Siracusa G, Felici M, Salustri A. Meiotic maturation of the mammalian oocyte. En: Ach RH, Balmaceda JP, Johnston I, editors. *Gamete Physiology*. 2º ed. New York: Raven Press; 1990. p. 129-144.

E) Comunicación a congreso: Bengston S, Solheim. Hatching assisted. XXII Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology; 1997 Jun 20-23; Roma, Italia. p. 1561-2.

Para la sección de debate se aceptarán textos (de no más de dos hojas DIN A4 a 30 líneas, incluidas un máximo de cinco citas bibliográficas y dos figuras si las hubiere), que reflejen la opinión de los diferentes firmantes sobre el tema de discusión que se propondrá en el número de la revista anterior.

Para las secciones de agenda y noticias se aceptarán escritos que informen de congresos u otros eventos relacionados con la Biología de la Reproducción o la actividad asociativa de ASEBIR, siempre que identifiquen de manera clara los organizadores de los mismos.



# ASEBIR

asebir@asebir.com | www.asebir.com

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



## VII CONGRESO

SEVILLA 2013 CENTRO DE CONVENCIONES GRAN SEVILLA

20-22  
NOVIEMBRE