

ASEBIR

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

JUNIO 2015 **VOL. 20 N° 1**

- 5** **IMPULSANDO LA FORMACIÓN Y EL CONOCIMIENTO.**
- 7** **REQUISITOS DOCUMENTALES PARA LA SOLICITUD DE INFORMES DE LA CNRHA.**
- 32** **METABOLÓMICA DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO.**
- 37** **¿DEBEMOS ANALIZAR EL X FRÁGIL EN DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES?**
- 53** **GANADORES DE LAS BECAS "AULA JOVEN" ASEBIR 2015**
- 55** **PROGRAMA VIII CONGRESO ASEBIR. SAN SEBASTIÁN 2015.**

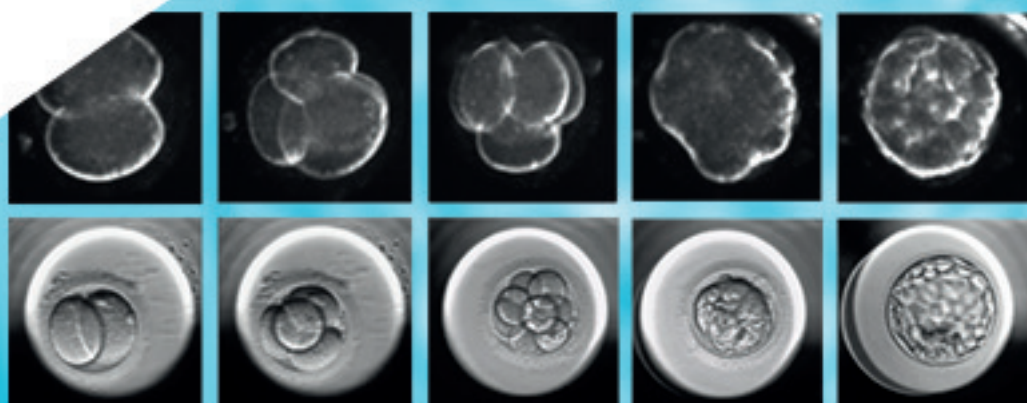


Imagen portada:
Sistemas time lapse.

SUMARIO

EDITORIAL5

Impulsando la formación y el conocimiento.
Montse Boada

ACTUALIDAD7

Requisitos documentales para la solicitud de informes de la CNRHA.

Presentación del "Cuaderno de Valoración de Oocitos y Embriones. III Ed".
M^a Victoria Hurtado de Mendoza

Consecuencias inmediatas de la Directiva Europea 2015/565.
JA Castilla, A Clavero, MC Gonzalvo,
ML López-Regalado

AULA JÓVEN17

Resultados de ciclos ICSI y calidad embrionaria con espermatozoides extraídos por biopsia testicular.

Nuria Zopeque; Javier M^a Gutiérrez; Mercedes Calero; Cristina Carrasco; Santiago García;
María de los Ángeles Bailén.

Células uNK en la interfaz materno-fetal y regulación mediante interacciones KIR/HLA-C.
Juan Carlos Almazán Milla

Metabolómica del medio de cultivo embrionario.
A.García; C. Olmedo; N. Díaz; I. Cuevas

¿Debemos analizar el X frágil en donantes de gametos y embriones?

María Fernández Díaz; Sara Atienza de Nava;
Begoña Arnott Fernández; Ignacio Arnott Fernández; Abel Gayo Lana

Análisis de posibles indicadores de tasa de obtención de blastocistos: edad materna, baja concentración de oxígeno y time lapse.
Olga Hortala; Aida Casanovas

FORMACION CONTINUADA47

La tecnología del time-lapse y su aplicación en las clínicas de reproducción Asistida.
M. Meseguer y Yamileth Motato

NOTICIAS53

Ganadores de las becas "Aula Joven" Asebir 2015.

Asebir en el II premio de arte Ginefiv.

Programa VIII Congreso Asebir. San Sebastián 2015.

AGENDA59

Agenda Formación Asebir 2015.

Junio 2015 Vol. 20 N°1

EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. M^a Dolores Lozano Arana. HU Virgen del Rocío- Sevilla
Dra. Inmaculada Campos Ramírez. IVI Almería-Almería

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Dra. Montserrat Boada Palá. Institut Universitari Dexeus-
Barcelona

Vicepresidenta:

Dra. M^a José Torelló Ibañez . Hospital Quirón Barcelona-
Barcelona

Secretaría y RRPP:

Dra. Anna Serra Peruchet. IBILAB-Illes Balears

Tesorería:

Dr. Josep Santaló Pedro. Universidad Autónoma de Barcelona-
Bellaterra

Patrocinios:

Dra. Aranzazu Galán Rivas. IVI Valencia-Valencia

Vocalía de Grupos de interés e investigación:

Dra. Laura Marqués Soler. Centre de Reproductio Asistida,
Clínica Sagrada Família-Barcelona

Vocalía de Publicaciones y Congresos

Dra. M^a Dolores Lozano Arana. HU Virgen del Rocío- Sevilla
Dra. Inmaculada Campos Ramírez. IVI Almería-Almería

Vocalía de Docencia y Formación

Dr. Francisco Javier Vendrell Montón. Sistemas genómicos S.L.,
Sueca-Valencia
Dr. José Luis de Pablo Franco. ART Vitoria, Vitoria.

Vocalía Tecnología de la información y comunicación

Dr. Abel Gayo Lana. FIV4-Instituto de Reproducción
Asturiano, Oviedo
Dr. Enrique Olaya Vila. Clínica Tambre, Madrid

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, 6ª / 28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94
www.asebir.com · asebir@asebir.com

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Góbaló, Agencia Creativa Digital
c/ Castillo de Fuensaldaña 4 · 28232 Las Rozas, Madrid
Tfno.: 91 626 39 74 · www.gobalo.es · hola@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424
Soporte válido: 78-R-CM

IMPULSANDO LA FORMACIÓN Y EL CONOCIMIENTO

Potenciar la formación continuada de sus socios y fomentar la adquisición e intercambio de conocimiento es una de las prioridades de ASEBIR. Las publicaciones en sus distintos formatos y el Congreso en el que prácticamente todos participamos mandando comunicaciones, o simplemente asistiendo, son buena prueba de ello. Durante los tres días de congreso surgen infinidad de momentos en los que miembros de distintos equipos intercambian opiniones y comparten experiencias haciendo nuestro congreso mucho más enriquecedor que cualquier otro.

Uno de los objetivos principales que nos marcamos la junta directiva actual era ampliar la oferta de **Becas para el 2015**. Me enorgullece poder informar que tenemos nuevas opciones que espero os resulten atractivas.



Con el fin de premiar a los que optan por conseguir la certificación en Embriología Clínica de ASEBIR, este año se concederá un premio a la mejor calificación obtenida en el examen que tendrá lugar en el marco del VIII Congreso ASEBIR de San Sebastián. El premio consistirá en la inscripción, viaje y alojamiento gratuito a un curso de ASEBIR, a elegir por el afortunado o afortunada. Siguiendo en la línea de ayudar a los socios más jóvenes se han continuado ofreciendo dos becas a los mejores artículos científicos del Aula Joven de nuestra revista. Podéis encontrar el nombre de los ganadores en este número de la revista. ¡Enhorabuena a ambos, tenéis la inscripción gratuita al congreso!

Otra de las novedades más interesantes son las tres bolsas de viaje dotadas con 1500 euros cada una que ASEBIR concede para estancias en el extranjero. Podrán optar a ellas cualquier socio que tenga previsto realizar una estancia de trabajo en un centro extranjero de TRA o de investigación en el ámbito de la biología de la reproducción. Desde ASEBIR pensamos que la movilidad debe fomentarse y esperamos que estas nuevas ayudas contribuyan a ello. ¡Os animamos a solicitarlas!

Por último, ASEBIR otorga varios premios de distinta dotación económica a las mejores comunicaciones científicas presentadas al Congreso: el ya tradicional Premio ASEBIR al mejor póster, los premios EMB-ASEBIR a las mejores comunicaciones orales de Embriología Clínica y de Investigación Básica, y este año, como novedad, el premio MERCK-ASEBIR a la mejor comunicación de Criobiología. Agradecemos enormemente la contribución de las casas comerciales e industria farmacéutica que con su patrocinio los hacen posibles.

No quiero terminar sin animaros a participar beneficiándoos de alguna de las opciones que ASEBIR os brinda. Las bases de las distintas convocatorias podéis encontrarlas en nuestras páginas Web <http://asebir.com> y <http://congresoasebir.es>

¡Nos vemos en San Sebastián!

Montse Boada

Presidenta ASEBIR 2013-2017



Irvine **Scientific**

Algo está cambiando...

www.biocareeurope.com
info@biocareeurope.com





MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

COMISIÓN NACIONAL DE
REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

REQUISITOS DOCUMENTALES PARA LA SOLICITUD DE INFORMES DE LA CNRHA

05/02/2015

Según establece la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida (TRA), la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA), órgano colegiado dependiente del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, tiene encomendada la función de realizar informes preceptivos previos ante una serie de supuestos que contempla el artículo 20.4 de la citada Ley.

A continuación se describen los requerimientos documentales que se precisan para el correcto análisis y evaluación de las solicitudes de informe que la CNRHA recibe en relación a cuatro de los supuestos contemplados en la Ley 14/2006:

1. Para la autorización de técnicas de diagnóstico genético preimplantacional con finalidades no contempladas en el artículo 12.1 (DGP). Quedan excluidas las técnicas de DGP que se realizan en combinación con la determinación de antígenos de histocompatibilidad con fines terapéuticos para terceros.
2. Para la autorización de técnicas de DGP en combinación con la determinación de antígenos de histocompatibilidad con fines terapéuticos para terceros (DGP+HLA).
3. Para la autorización de proyectos de investigación relacionados con el desarrollo y aplicación de las técnicas de reproducción humana asistida (PI).
4. Para la autorización de la aplicación de técnicas experimentales como es la inserción de tejido ovárico crioconservado o criopreservado.

La CNRHA podrá solicitar, para mejor valoración, información adicional en los casos que precise.

DOCUMENTACIÓN REQUERIDA EN LAS SOLICITUDES DE INFORME PARA DGP CON FINALIDADES NO CONTEMPLADAS EN EL ARTÍCULO 12.1 DE LA LEY 14/2006.

Autoridades sanitarias autonómicas:

1. **Solicitud de informe preceptivo** de la CNRHA.

Centro o servicio de Reproducción Humana Asistida:

2. **Solicitud de autorización** para la realización de un ciclo de DGP identificando el nombre completo de la pareja y la enfermedad implicada.
3. **Acreditación del centro o servicio de RHA:** Copia de la autorización en vigor para el funcionamiento del centro o servicio, donde figure la oferta asistencial autorizada.
4. **Acreditación del centro o servicio de genética**, solo si es diferente al centro o servicio de RHA.
5. **Informe médico** del miembro de la pareja enfermo y, en su caso, de los familiares también afectados, detallando la edad de aparición y la situación clínica actual.
6. **Resultados de los análisis genéticos** del miembro de la pareja y familiares que padecen la enfermedad.
7. **Informe de consejo genético** que incluya:
 - Información sobre la enfermedad genética: identificación del gen implicado, mutación responsable de la enfermedad, tipo de herencia, penetrancia, expresividad y grado de certeza de la relación fenotipo/genotipo.
 - Interpretación y valoración individualizada de la gravedad de la mutación identificada de acuerdo a, los resultados genéticos, el historial clínico del paciente y los datos familiares.
 - Asesoramiento reproductivo que incluya información sobre la probabilidad de transmisión a la descendencia y, sobre las opciones reproductivas, con sus alcances y limitaciones, implicaciones éticas, posibles efectos adversos y complicaciones, de todas las alternativas disponibles.
8. **Informe clínico ginecológico y andrológico** que especifique la edad de ambos miembros de la pareja y la capacidad reproductiva de la pareja (recuento de folículos antrales y perfil hormonal básico, en el caso de la mujer y, seminograma, en el caso del hombre).
9. **Formularios de consentimiento informado** firmados por la pareja solicitante y actualizados. La información imprescindible que deben contener es:
 - Descripción de los procedimientos implicados (FIV, biopsia embrionaria y técnicas diagnósticas), riesgos y limitaciones.
 - Probabilidades de obtener embriones sin la mutación mediante la aplicación de las técnicas solicitadas conforme al estado del conocimiento actual.

- Aproximación a las probabilidades de éxito en el centro o servicio de RHA solicitante, teniendo en cuenta las características particulares del caso concreto.
- Información relativa a los aspectos jurídicos y éticos de las técnicas que van a ser realizadas, y relativa a las condiciones económicas del tratamiento.
- Posibilidad de revocación del consentimiento en cualquier momento.
- Información relativa al compromiso del centro o servicio de garantizar la protección de los datos personales.
- Debe quedar explícito que la pareja decide llevar a cabo el DGP como la opción terapéutica que más se ajusta a sus necesidades y puntos de vista y aceptan los riesgos y complicaciones de los que han sido informados previamente, de forma adecuada y comprensible, y de los que se han dado por enterados.

Para una PRIMERA SOLICITUD de estas técnicas, los centros o servicios de RHA deberán aportar también:

1. Información de la experiencia del centro o servicio de RHA en cuanto al número de ciclos realizados con DGP y resultados (porcentaje de gestaciones obtenidas y, si fuera posible, de recién nacidos libres de mutación).
2. Información de la experiencia del laboratorio o servicio de genética y de los resultados en términos de eficacia diagnóstica.
3. Especificación del procedimiento coordinado de trabajo entre el centro o servicio de RHA y el laboratorio o servicio de genética.

DOCUMENTACIÓN REQUERIDA EN LAS SOLICITUDES DE INFORME PARA DGP+HLA.

Autoridades sanitarias autonómicas:

1. **Solicitud de informe preceptivo** de la CNRHA.

Centro o servicio de Reproducción Humana Asistida:

2. **Solicitud de autorización:** para la realización de un ciclo de DGP+HLA identificando el nombre completo de la pareja, nombre del paciente para el que se solicita la selección embrionaria y la enfermedad implicada.
3. **Acreditación del centro o servicio de RHA:** Copia de la autorización en vigor concedida por la autoridad sanitaria autonómica para el funcionamiento del centro o servicio, donde figure la oferta asistencial autorizada.
4. **Acreditación del centro o servicio de genética,** solo si es diferente al centro o servicio de RHA.
5. **Informe médico:** detallado y actualizado del paciente para el que se solicita selección embrionaria, incluyendo:
 - Los tratamientos aplicados con anterioridad y su resultado.
 - El tratamiento actual.
 - La indicación clara de trasplante progenitores hematopoyéticos para el paciente, especificando si se trata de una indicación consolidada de trasplante o si éste es de carácter experimental, aportando las evidencias existentes al respecto.
 - La ausencia de donantes familiares compatibles.
 - La fecha de inicio de la búsqueda de donante no emparentado en el REDMO, así como los resultados de ésta. En el caso de que no se haya puesto en búsqueda al paciente, justificación de esta decisión.
6. **Compromiso escrito del centro o servicio que llevará a cabo el trasplante** de células de cordón umbilical, si se logra la generación de un donante por la vía solicitada.
7. **Información de la pareja:** en cuanto a edad y antecedentes reproductivos de la pareja.
8. **Información de la experiencia previa del centro o servicio de genética:** en realización de DGP y determinación de HLA en preembriones, especificando las enfermedades y el número de casos de cada enfermedad.
4. **Formularios de consentimiento informado:** firmados por la pareja solicitante y actualizados. La información imprescindible que debe constar es:
 - Probabilidades de éxito en la generación de un donante HLA idéntico mediante la aplicación de las técnicas solicitadas conforme al estado del conocimiento actual.
 - Aproximación a las probabilidades de éxito en el centro o servicio de RHA solicitante, teniendo en cuenta las características particulares del caso concreto.

- Información relativa a los aspectos jurídicos y éticos de las técnicas que van a ser realizadas, y relativa a las condiciones económicas del tratamiento.
- Posibilidad de revocación del consentimiento en cualquier momento.
- Información relativa al compromiso del centro o servicio de garantizar la protección de los datos personales.
- Debe quedar explícito que la pareja decide llevar a cabo el DGP + HLA como la opción terapéutica que más se ajusta a sus necesidades y puntos de vista y aceptan los riesgos y complicaciones de los que han sido informados previamente, de forma adecuada y comprensible, y de los que se han dado por enterados.

DOCUMENTACIÓN REQUERIDA EN LAS SOLICITUDES DE INFORME DE PI

Autoridades sanitarias autonómicas:

1. **Solicitud de informe preceptivo** de la CNRHA.

Centro o servicio de Reproducción Humana Asistida:

2. **Solicitud de autorización:** para la realización de un proyecto de investigación relacionado con el desarrollo y aplicación de técnicas de reproducción humana asistida, identificando el título del mismo, el nombre completo del investigador principal y el centro o servicio de RHA donde se llevará a cabo.
9. **Acreditación del centro o servicio de RHA:** Copia de la autorización en vigor concedida por la autoridad sanitaria autonómica para el funcionamiento del centro o servicio, donde figure la oferta asistencial autorizada.
3. **Dictamen favorable del Comité ético de investigación clínica.** Este Comité deberá evaluar la idoneidad científica del proyecto, su pertinencia, su factibilidad y la adecuación del protocolo a los objetivos planteados.
4. **Certificado de compromiso del investigador principal.**
5. **Certificado de autorización de la dirección del centro o servicio de RHA** donde se llevará a cabo el proyecto.
6. **Protocolo del proyecto de investigación:** deberá incluir justificación del número de pacientes o donantes reclutados o, en su caso, el número de gametos o embriones necesarios.
7. **Hoja de información a participantes.**
8. **Modelo de formulario de consentimiento informado** que se entregará a los pacientes que participen en el proyecto y será específico para dicho proyecto.
9. **Modelo de contrato entre donantes y el centro** específico para el proyecto, en caso de que la investigación se realice con donantes de gametos.
10. **CV investigador principal e identificación del equipo investigador** que deberá ser diferente del equipo que realiza las técnicas de RHA.
11. **Memoria económica** en la que figure que no será sufragado ningún gasto de la investigación por parte de los participantes del estudio.

DOCUMENTACIÓN REQUERIDA EN LAS SOLICITUDES DE INFORME PARA APLICACIÓN DE TÉCNICAS EXPERIMENTALES (Reinserción de tejido ovárico criopreservado).

Debido a que la utilización de tejido ovárico con fines reproductivos se considera una técnica experimental, se requiere la siguiente documentación específica:

1. **Acreditación del centro o servicio quirúrgico que realizará el implante:** Copia de la autorización en vigor concedida por la autoridad sanitaria autonómica para el funcionamiento del centro o servicio, donde figure la oferta asistencial autorizada.
2. **Información de la experiencia quirúrgica** del centro o servicio que realizará el implante.
3. **Acreditación del centro o servicio extractor y de almacenamiento del tejido ovárico**, solo si es diferente al centro que realizará el implante.
4. **Especificación del procedimiento coordinado de trabajo** entre el laboratorio que almacena el tejido ovárico y el centro o servicio quirúrgico, en caso de ser diferentes.
5. **Informe médico** detallado y actualizado de la paciente para la que se solicita dicha técnica.
6. **Formularios de consentimiento informado** firmados por la paciente que se someta a esta técnica y actualizado. La información imprescindible que debe constar es:
 - Probabilidades de éxito reproductivo tras reinserción del tejido ovárico conforme al estado del conocimiento actual.
 - Aproximación a las probabilidades de éxito en el centro o servicio de RHA solicitante, teniendo en cuenta las características particulares del caso concreto.
 - Experiencia del centro o servicio en la utilización de la técnica y el procedimiento quirúrgico previsto.
 - Información relativa a los aspectos jurídicos y éticos de la técnica que va a ser realizada, y relativa a las condiciones económicas del tratamiento.
 - Posibilidad de revocación del consentimiento en cualquier momento.
 - Información relativa al compromiso del centro o servicio responsable de la paciente de garantizar la protección de los datos personales.
 - Debe quedar explícito que la paciente decide llevar a cabo esta técnica experimental como la opción terapéutica que más se ajusta a sus necesidades y punto de vista y acepta los riesgos y complicaciones de los que ha sido informada previamente, de forma adecuada y comprensible, y de los que se ha dado por enterada.

Para una PRIMERA SOLICITUD de estas técnicas, los centros o servicios de RHA deberán aportar adicionalmente la documentación detallada en el apartado de requisitos para proyectos de investigación.

PRESENTACIÓN DEL “CUADERNO DE VALORACIÓN DE OOCITOS Y EMBRIONES”

M Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
Presidenta del GIE



En nombre de todos los miembros del GIE, y el mío propio, queremos presentaros la 3ª edición del “Cuaderno de Valoración de Oocitos y Embriones”. Esta edición es el fruto de la adaptación del criterio ASEBIR al conocimiento actual.

Desde el principio ASEBIR ha considerado que es indispensable disponer de unos criterios de valoración de los embriones que se correlacionasen eficazmente con las características del embrión y su capacidad de generar un embarazo. A día de hoy continua siendo válida la clasificación morfológica frente a las tecnologías más novedosas que o bien no están al alcance de todos los laboratorios, como sucede con el criterio morfocinético que requiere de un sistema Time-lapse, o bien no han llegado a demostrar la eficacia esperada como ocurre con la metabolómica. Aunque somos conscientes que las nuevas tecnologías darán más información, hemos creído necesario realizar esta actualización. En todo caso, al tratarse de un proceso dinámico, la clasificación ASEBIR siempre está abierta a nuevos cambios.

Cabe destacar de esta 3ª edición del cuaderno las siguientes novedades:

1. Se siguen manteniendo las 4 categorías A, B, C y D, en orden descendente de potencial de implantación, si bien hemos introducido una recomendación específica para excluir

de la clasificación aquellos embriones que no deberían ser ni transferidos ni congelados ya que su potencial implantatorio es prácticamente nulo.

2. En base a los resultados de implantación, los embriones de 2 blastómeros en D+2 pasan de categoría B a categoría C.

3. En el apartado de simetría se definen los términos “estadio-específico” (simetría celular correcta) y no “estadio-específico” (simetría incorrecta) respecto a las divisiones embrionarias para sustituir a los términos “células iguales-desiguales”. Además, se ha realizado el cambio de categoría de los embriones de 7 blastómeros no estadio-específicos que pasan de categoría A a categoría B.

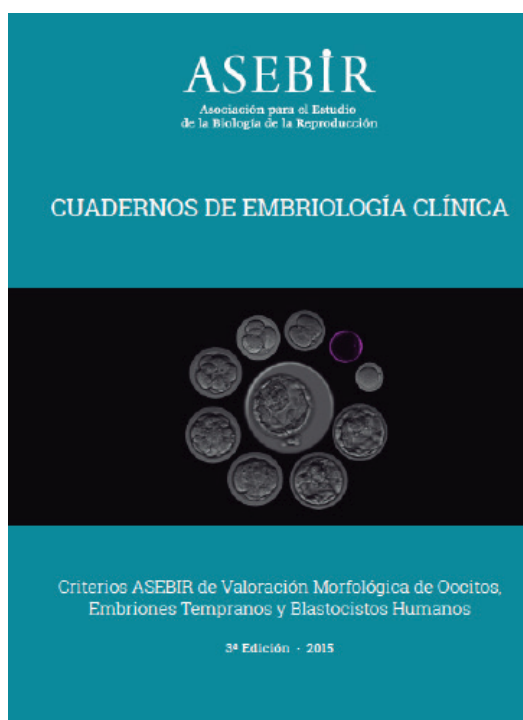
4. Respecto a los embriones multinucleados, pasan de categoría D a categoría C aquellos embriones con características óptimas pero que presentan un blastómero binucleado en D+2 o 2 blastómeros binucleados en D+3.

5. Se presenta un capítulo nuevo, publicado recientemente, sobre el estadio D+4.

6. Las Tablas para un mejor manejo y comprensión de la clasificación embrionaria se han modificado y adaptado para facilitar su uso en el trabajo diario.

Por último, es importante destacar que esta clasificación embrionaria se creó para aplicarla a oocitos y embriones en fresco y, por tanto, **no es válida para clasificar embriones criopreservados** cuyas particularidades no se han tenido en cuenta en este Cuaderno.

Esperamos que todo este trabajo sea de vuestro agrado y sirva para resolver la mayoría de las dudas que nos planteasteis los asociados en su día. Si bien, al tratarse de un proceso dinámico, el cuaderno sigue abierto a los futuros cambios, no tan lejanos, que las nuevas tecnologías nos aporten.



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 medios y 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.

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

*Según criterios ASEBIR de valoración 2015

Con la colaboración de:

Ceifer

CONSECUENCIAS INMEDIATAS DE LA DIRECTIVA EUROPEA 2015/565 SOBRE CODIFICACIÓN DE CÉLULAS Y TEJIDOS HUMANOS

JA Castilla, A Clavero, MC Gonzalvo, ML López-Regalado U. Reproducción, CHU Granada, Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (IIBG), y Departamento Anatomía y Embriología Humana, U. Granada

El pasado mes de abril se publicó en el diario oficial de la Comisión Europea la Directiva (UE) 2015/565 de 8 de abril de 2015 por la que se modifica la Directiva 2006/86/CE en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la codificación de células y tejidos humanos. Dicha directiva por tanto afecta directamente a gametos y embriones. La directiva establece que debe asignarse un código único europeo (SEC) que permita la identificación de los gametos y embriones donados fuera de la pareja que se distribuyan para su uso en humanos. Dicho código se compondrá de 40 caracteres, 21 corresponderán a la secuencia de identificación de la donación (DEC) y 19 a la secuencia de identificación del producto (PEC).

Esta directiva excluye a los gametos y embriones que se utilicen dentro de la pareja, pero afecta a los gametos y embriones de donante que se almacenen para su posterior distribución. En caso de donación en fresco (ovocitos) deja a la decisión de las autoridades competentes nacionales su aplicación o no.

Aunque la directiva recientemente aprobada establece la entrada en funcionamiento del SEC a los 18 meses de su publicación (octubre 2016), nos gustaría destacar algunas repercusiones inmediatas de dicha directiva. A partir de esa fecha todos los gametos y células almacenadas que no tengan SEC deberán usarse en un plazo de 5 años desde esa fecha. Y a partir de esa fecha (octubre 2016) toda célula que se almacene deberá poseer su SEC. En caso de que dicho código no pueda adherirse al soporte primario (ej., pajueta o dispositivo de vitrificación) deberá de adjuntarse el SEC en una hoja separada, que se empaquetará con el soporte primario de manera que se garantice que permanezcan juntos, y el SEC esté vinculado de forma inequívoca a las células.

Dado que dentro del DEC se incluye un código referido al centro donde se realiza la donación, la directiva establece que las autoridades competentes de los Estados miembros deben actualizar el registro de establecimientos de tejidos, reflejando cualquier cambio en las acreditaciones, designaciones, autorizaciones o aprobaciones de los establecimientos de Tejidos. Esto significa que nuestra autoridad sanitaria debe actualizar el registro de centros pues actualmente los centros españoles se encuentran incluidos en EURO CET pero no en EURO CET128. EURO CET es una plataforma virtual de información que contiene registros de las autoridades competentes y de los establecimientos de reproducción asistida en la Unión Europea. Los estados colaboran voluntariamente suministrando datos anualmente de la actividad realizada en ellos. Esta plataforma está organizada por el Centro de trasplantes italiano. Sin embargo, EURO CET128 es un contrato de servicios, el cual utiliza lo realizado por EURO CET para crear una plataforma de codificación de la UE que estará organizada por la Comisión Europea para implantar el SEC. Dicha plataforma contendrá, entre otros, el Compendio de centros de reproducción asistida.

Actualmente la mayoría de centros españoles poseemos un código de EURO CET, pero no estamos incluidos en el compendio de centros de UROCET128. Para estar incluidos la autoridad sanitaria tiene que demostrar ante EURO CET128 que dichos centros siguen las directivas europeas de bancos de tejidos y células. Por esto se están empezando a realizar en muchas comunidades autónomas inspecciones siguiendo dichas directivas, con el objeto de poder incluir a dichos centros en el compendio de centros de EURO CET128.

ASEBIR manifestó en el documento, disponible en la web de ASEBIR,

“Recomendaciones para la aplicación del RD 1301/2006” (ahora Real Decreto-Ley 9/2014), los múltiples conflictos interpretativos de este Real Decreto. Esto hace que ASEBIR haya solicitado a las autoridades sanitarias competentes que dicho documento sirva de referencia para la interpretación de dicha norma.

Otro componente de DEC es el número único de donación. La manera para asignarlo deberá ser establecida por la autoridad sanitaria, pudiendo ser centralizado a nivel nacional, internacional o por centros. El desarrollo de sistemas informáticos para obtener dicho número se establece en la directiva. Es evidente, que este número único de donación debería implantarse junto al Registro de donantes de gametos, pues la coordinación entre ambos, si se planifica desde el inicio, será bastante más fácil que si se desarrollan por separado. Por esto creemos fundamental desarrollar ambos objetivos, desde ya de forma paralela.

RESULTADOS DE CICLOS ICSI Y CALIDAD EMBRIONARIA CON ESPERMATOZOIDES EXTRAIDOS POR BIOPSIA TESTICULAR

OUTCOME OF INTRACITOPLASMATIC SPERM INJECTION AND EMBRYO QUALITY USING TESTICULAR SPERMATOZOA.

Nuria Zopeque.^{1*}Javier M^a Gutiérrez¹, Mercedes Calero¹, Cristina Carrasco¹, Santiago García¹, María de los Ángeles Bailén¹.

¹Hospital Universitario Puerta del Mar.

*nuria_zop@hotmail.com

Resumen: El objetivo de nuestro estudio es evaluar los resultados de ciclos ICSI (microinyección intracitoplasmática), así como la calidad de embriones generados, con el uso de espermatozoides testiculares. Se analizaron ciclos con espermatozoides testiculares tras TESE (extracción de espermatozoides testiculares) (grupo de estudio o grupo 1) y como grupo control (grupo 2), se incluyeron ciclos donde el varón presentaba Oligoastenoteratozoospermia (OAT) severa. La técnica TESE-ICSI es un método eficaz para conseguir embriones de buena calidad en parejas con factor masculino por azoospermia y proporciona buenos resultados en términos de embarazo. Sin embargo, estos resultados son similares a los obtenidos con espermatozoides de eyaculado cuando existe una alteración fisiológica en la síntesis o eyaculación del semen.

Palabras clave: Azoospermia, microinyección intracitoplasmática, espermatozoides testiculares, espermatozoides de eyaculado, resultados reproductivos, calidad embrionaria.

Abstract: The aim of our study is to assess the outcome after ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) and the embryo quality, using testicular spermatozoa. ICSI cycles with testicular spermatozoa after TESE (testicular sperm extraction) (group 1) and cycles with ejaculated spermatozoa in patients with severe Oligoastenoteratospermia (OAT) (group 2) were included.

The technique TESE-ICSI is an effective method to get good quality embryos in couples with male factor for azoospermia and provides good results in terms of pregnancy. However, these results are similar to those obtained with ejaculated spermatozoa when there is a physiological disorder in the synthesis or ejaculation of spermatozoa..

Key words: Azoospermia, Sperm Injections, Intracytoplasmic, ejaculated spermatozoa, testicular spermatozoa, pregnancy outcomes, embryo quality.

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 50% de las parejas que sufren esterilidad es por causa masculina y dentro de éstas, el 15 % de los varones sufren azoospermia (Wosnitzer, Goldstein et al. 2014). Según el manual de la OMS (Organización Mundial de la Salud) de 2010, se considera normozoospermia cuando la concentración de espermatozoides en el eyaculado es mayor de 15 millones/ml. Si esta concentración es menor se considera oligozoospermia. Nos referimos a azoospermia cuando existe una ausencia de espermatozoides en el eyaculado.

La azoospermia se clasifica clínicamente como azoospermia obstructiva (AO) (postesticular) y no obstructiva (ANO) (pretesticular o testicular). A pesar de que en la definición de ANO se incluye la incapacidad de producir

espermatozoides, en un 50-60% de los casos se observan focos de espermatogénesis.

En pacientes azoospermicos es posible obtener espermatozoides del testículo a través de la técnica clásica de biopsia abierta denominada TESE (extracción de espermatozoides testiculares). También se pueden recuperar espermatozoides del epidídimo por aspiración microquirúrgica (MESA) o por técnicas percutáneas (PESA).

La introducción de la ICSI (microinyección intracitoplasmática) combinado con TESE, permite el tratamiento del factor masculino severo debido a azoospermia. La cuestión principal es si el tipo de espermatozoide o su grado de deterioro influyen en los resultados (Zhang, Qiao et al. 2009). El inconveniente es que la realización de biopsia testicular trae asociados

dos problemas fundamentales: 1) la motilidad de los espermatozoides frescos obtenidos a menudo es pobre, por lo que la selección de espermatozoides viables se dificulta, y 2) la biopsia produce un efecto perjudicial sobre la espermatogénesis debido al trauma testicular (Windt, Coetzee et al. 2002).

ESPERMATOZOIDES TESTICULARES Y PROCEDENTES DEL EYACULADO.

Diversos grupos han demostrado que un número extremadamente limitado de espermatozoides en el eyaculado comprometen las tasas de fecundación y embarazo (Strassburger, Friedler et al. 2000, Ben-Ami, Raziell et al. 2013). Esto ha sido atribuido a la contaminación celular en el eyaculado y a la exposición de radicales libres de oxígeno (Li, Shang et al. 2004). Los espermatozoides son susceptibles al

daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidativo afecta a la fluidez de la membrana plasmática y al ADN espermático. Al mismo tiempo, la peroxidación lipídica y sus metabolitos propician la apoptosis, disminuyendo el recuento de espermatozoides y deteriorando su calidad. También se ha observado mayor frecuencia de roturas en el ADN en espermatozoides procedentes de eyaculado que en los testiculares, lo que se asocia a peores resultados reproductivos. Por tanto, estos pacientes son candidatos a TESE, ya que los espermatozoides testiculares a priori están más capacitados para generar embriones viables (Greco, Scarselli et al. 2005).

Existen dos tipos de efectos paternos que pueden afectar a los resultados de fertilidad, uno temprano y otro tardío (Tesarik 2005, Desai, AbdelHafez et al. 2009). El efecto temprano afecta al proceso post-fecundación, donde el centrosoma del espermatozoide influye directamente en el desarrollo temprano del embrión (Palermo, Colombero et al. 1997), ya que está implicado en el movimiento nuclear, en el alineamiento de los pronúcleos (Terada 2007) y en consecuencia en la calidad de los embriones generados. El efecto tardío se relaciona con los daños en el ADN espermático que pueden ocasionar un bloqueo de la expresión genómica embrionaria alrededor de las 72 horas post-fecundación, lo que se traduce una disminución en las tasas de implantación (Vanderzwalmen, Hiemer et al. 2008). Por estas razones es importante el estudio de la calidad de los embriones producidos por TESE-ICSI (Bolton, Hawes et al. 1989).

En los pacientes con OAT severa encontramos espermatozoides tanto en eyaculado como en testículo pero no está claro cuáles consiguen mejores resultados en ICSI. Existen muy pocos estudios comparando ambos tipos de procedimientos en el mismo paciente. Weissman et al (Weissman, Horowitz et al. 2008), estudiaron 4 parejas con OAT severa en las que se usaron espermatozoides de eyaculado y de biopsia testicular para realizar ICSI, consiguiendo embriones de calidad pobre y fallos repetidos de implantación con espermatozoides de

eyaculado, mientras que con el uso de espermatozoides testiculares se consiguió mejorar la implantación y mayor número de embarazos evolutivos. Bendikson et al. (Bendikson, Neri et al. 2008), compararon los resultados de ICSI usando ambos tipos de espermatozoides en 16 hombres diagnosticados de criptozoospermia, mostrando resultados favorables para los espermatozoides recuperados tras biopsia testicular.

El objetivo de nuestro estudio es evaluar lastasas defecundación, de implantación, de embarazo clínico y de nacido vivo por transferencia, así como evaluar la calidad de embriones generados con el uso de espermatozoides testiculares. Para ello se comparan los resultados de ciclos ICSI y de las calidades embrionarias conseguidas microinyectando por un lado espermatozoides testiculares extraídos mediante TESE y por otro, espermatozoides procedentes de eyaculado en pacientes que padecen OAT severa.

MATERIAL Y MÉTODOS POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo de casos y controles de pacientes, a los que se les realizó extracción de espermatozoides mediante TESE, entre enero de 2011 y mayo de 2014 en la unidad de reproducción asistida del Hospital Universitario Puerta del Mar. En el grupo de estudio (grupo 1) se incluyeron pacientes biopsiados a los que se realizó un ciclo de ICSI con los ovocitos recuperados de sus parejas tras punción folicular, formando un total de 30 ciclos. Como grupo control (grupo 2) se incluyeron parejas en las que el varón presentaba oligoastenoteratozoospermia (OAT) severa, y a los que se les realizó un ciclo de ICSI con espermatozoides de eyaculado en fresco, también durante los años 2011 y 2014, el número total de ciclos incluidos en este grupo fue 31. Siguiendo los criterios de OMS de 2010, los parámetros para diagnosticar una oligoastenoteratozoospermia severa es poseer una concentración de espermatozoides menor de 1 millón/ml, menos de 4% de formas normales y menos de 32% de espermatozoides móviles. En ambos grupos se excluyeron

aquellas parejas en las que existió factor femenino.

MÉTODOS

Todas las parejas acudieron a la consulta por esterilidad primaria y se les realizó historia clínica, anamnesis, examen físico y al menos dos espermiogramas. Se recogieron los siguientes datos: edad de ambos miembros, causa de TESE, número de espermatozoides móviles recuperados en ambos testículos en pacientes TESE, número de cúmulos recuperados, número de ovocitos maduros, número de ovocitos fecundados correctamente (2 corpúsculos polares (2CP) y 2 pronúcleos (2PN)), número de ovocitos con fecundación anómala (uno o más de dos pronúcleos), número de embriones de calidad A, B, C y D, embriones transferidos tanto en fresco como en TEC (transferencia de embriones congelados), día de transferencia (día 2 o día 3 tras la fecundación), beta-hcg (gonadotropina corionica humana) y número embarazos clínicos, de sacos embrionarios y de niños nacidos vivos. En pacientes con OAT severa los espermatozoides se recuperaron por Swim-up convencional anotándose además, la concentración espermática, porcentaje de formas normales y de espermatozoides móviles. En los casos en los que no se obtuvo REM (recuperación de espermatozoides móviles) se resuspendió el pellet en 0.4 ml como en un lavado simple. 0

Se consideró el test de embarazo positivo cuando la beta-hcg en sangre fue superior a 60 mU/ml a los 15 días de la transferencia embrionaria. El embarazo clínico se confirmó por la observación ecográfica de saco embrionario a las tres semanas del test de embarazo en sangre.

Con los datos anteriormente enumerados se calculó:

- Tasa de fecundación: Nº ovocitos con 2CP y 2 PN / Nº ovocitos maduros microinyectados.
- Tasa de fecundación anómala: Nº ovocitos con fecundación anómala / Nº de ovocitos maduros microinyectados.
- Tasa de implantación: Nº sacos embrionarios / Nº embriones

- transferidos (en fresco y congelados)
- Tasa de embarazo clínico por transferencia: Nº embarazos con saco embrionario/Nº transferencias.
 - Tasa de nacido vivo por transferencia: Nº niños nacidos / Nº transferencias (fresco/ congelados, teniendo en cuenta los embarazos gemelares)
 - Tasa de embarazo gemelar: Nº de embarazos gemelares / Nº de embarazos totales.
 - Tasa de aborto: Nº de abortos/ Nº de sacos embrionarios.
 - Porcentaje de embriones de calidad A, B, C y D.

Los resultados se compararon entre grupos 1 y 2 y por subgrupos en función del día de la transferencia (+2 o +3) y de la causa de biopsia testicular. El análisis estadístico se realizó mediante hoja simple Excel y programa estadístico SPSS. Las medias se compararon a través del test T de Student y tasas a través de χ^2 de Pearson.

EXTRACCIÓN DE ESPERMATOZOIDES TESTICULARES MEDIANTE TESE.

Todos los pacientes masculinos susceptibles de biopsia testicular fueron derivados a la Unidad de Urología donde fueron valorados e incluidos en el programa TESE. La obtención de la muestra se realizó por biopsias abiertas que se llevaron a cabo en el quirófano de urología bajo sedación. La biopsia se realizó días antes de la punción folicular de sus respectivas parejas por lo que los espermatozoides recuperados fueron criopreservados.

Se obtuvieron muestras de testículo izquierdo (TI) y testículo derecho (TD) que fueron recogidas en dos tubos, ambos con 10 ml de medio de cultivo Puresperm Wash (Nidacom) a 37°C. Posteriormente, se procedió a la recuperación de los espermatozoides a través de disgregación mecánica del tejido testicular. Evaluamos la presencia de espermatozoides de cada muestra y posteriormente, ambas fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1800 rpm (500 g). Los pellet resultantes fueron resuspendidos en 0.5 ml de Puresperm Wash (Nidacom) y volvimos a evaluar la presencia o no de espermatozoides en cada muestra por separado.

Consideramos las muestras aptas para su congelación cuando observamos más de un espermatozoide móvil por campo 20x tras la centrifugación. En caso de que los espermatozoides recuperados tras centrifugar fueran inmóviles, se añadió pentoxifilina. Observamos si mejoraba la movilidad y valoramos si procedía congelar la muestra.

Las muestras fueron congeladas por separado, por un lado TI y por otro TD con el medio de congelación CryoSperm (Origio) y fueron almacenadas en el criotank hasta el día de la obtención de los ovocitos. Tras descongelarse, el contenido de la pajueta se mezcló con 1 ml de Puresperm Wash (Nidacom) y fue centrifugada 5 minutos a 1800 rpm (500 g), para eliminar los restos de crioprotector. Tras decantar el sobrenadante, resuspendimos el pellet en 0.4 ml de medio IVF Plus (Vitrolife, serie G5) y valoramos la supervivencia espermática.

CAPTACIÓN DE OVOCITOS TRAS PUNCIÓN FOLICULAR Y CULTIVO EMBRIONARIO.

Para conseguir el mayor número de ovocitos posible se estimuló a la paciente de forma controlada mediante la administración de gonadotropinas, según la indicación de cada paciente. La aspiración folicular guiada por ecografía transvaginal, fue efectuada a las 36 horas de la administración de la hCG.

Los ovocitos fueron recuperados inmediatamente tras la punción y mantenidos en cultivo a 37°C y 6% de CO₂ en medio IVF Plus (Vitrolife, serie G5) en incubador Heracell 150. Tras 2-4 horas de cultivo, los ovocitos fueron decumulados y aquellos que se encontraban en estadio metafase II fueron microinyectados y después cultivados en medio G1 Plus (Vitrolife, serie G5). La evaluación de la fecundación se realizó entre las 18-20 horas posteriores al ICSI y partir de este momento, los cigotos correctamente fecundados se mantuvieron en cultivo hasta el día+2 o día+3.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA Y TRANSFERENCIA.

La evaluación de la calidad embrionaria se realizó siguiendo los criterios de calidad

de ASEBIR: A, B, C y D. Consideramos embriones de buena calidad para su transferencia, aquellos de calidad A y B.

La transferencia se realizó de manera ecoguiada, con catéteres de transferencia Labotec y los embriones fueron cargados en los catéteres con medio de cultivo G2 Plus (Vitrolife, serie G5). Si el número de embriones fue menor o igual a cuatro, se realizó en día+2. Si fue mayor o igual a cinco, se hizo en día +3. En todas ellas se transfirieron 2 embriones.

RESULTADOS

Las causas de TESE-ICSI fueron, vasectomía en 15 casos, y otros 15 con azoospermia tanto secretora como obstructiva.

Se calculó que el tamaño muestral mínimo para obtener una significación estadística, era de 105 ciclos, por tanto debido a que el número total de ciclos en nuestro estudio fueron 61, a pesar de que haya claras diferencias ninguna será estadísticamente significativa.

De los 30 ciclos TESE, hubo un fallo de fecundación, 20 ciclos con transferencias en fresco en día 2 o 3 tras la fecundación y 9 se vitrificaron al no realizarse la transferencia por SHO (síndrome de hiperestimulación ovárica). Posteriormente se transfirieron tras ser desvitrificados. En todos los pacientes se recuperaron espermatozoides tras la intervención.

La media de espermatozoides móviles por campo observados a microscopio 20x recuperados tras la biopsia en testículo derecho (TD) fue de 4.2 ± 0.89 y en testículo izquierdo (TI) fue de 3.5 ± 0.58 .

En los componentes del grupo control, la concentración media de espermatozoides en millones por mililitro fue 0.50 ± 0.28 . Del total de 31 ciclos, en 3 de ellos no se obtuvo ningún ovocito fecundado. Se realizaron 24 transferencias en fresco y en 4 casos se vitrificaron todos los embriones por riesgo de SHO que posteriormente se transfirieron mediante transferencia de embriones congelados (TEC). Se realizó TEC en un total de 7 parejas, a dos de ellas se realizaron 2, por lo que finalmente hubo un total de 9 TEC.

Las tasas de fecundación, fecundación anómala, implantación, embarazo y nacido vivo por transferencia en fresco del grupo 1 y 2 se expresan en la tabla I.

La tasa de fecundación fue similar en ambos grupos (53.7% vs 53.9%), aunque si nos fijamos por subgrupos de pacientes TESE, la mejor tasa de fecundación se consigue en los en vasectomizados (60.8%). Por otro lado la tasa de fecundación anómala fue significativamente mayor en el grupo 1 (6.6% vs 3%) debido a que la tasa en los vasectomizados elevó dicho porcentaje (10.4%). La mejor tasa de implantación se consiguió en el grupo de los pacientes 1 (42.1% vs.16.6%), siendo el subgrupo de vasectomía el que mejor tasa de implantación aporta (48 %).

En cuanto a la tasa de embarazo y nacidos vivos por transferencia, se observa como siempre el grupo 1 supera al grupo 2, y especialmente los pacientes vasectomizados.

La tasa de aborto en el grupo 1 fue 18.7% (21% en vasectomizados y 18.7% en azoospermicos) y en el grupo 2, 28.6%. La tasa de gemelares en el grupo 1 fue 60% (50% en vasectomías y 100% en azoospermicos) notablemente superior a las del grupo 2 (16.6%).

En las transferencias en congelado del grupo 1 se obtuvo un 22.2% de embarazos clínicos, 11.1% de nacidos vivos con una tasa de aborto del 50%, no se realizó el cálculo entre grupos debido al escaso número de representantes en cada uno de ellos. En el grupo 2 fue 40% de embarazo clínico, 30% de nacidos vivos con una tasa de aborto del 40%.

Por lo que respecta al día de transferencia embrionaria, en ambos grupos se observa cómo hay mayor eficiencia en los resultados del día +3. Comparando entre los dos grupos, el de pacientes TESE tiene mejores tasas en día +3 que los pacientes con OAT severa.

Los datos de calidad embrionaria, se expresan a continuación en la tabla II. Se puede observar como el grupo 1 tiene un porcentaje de embriones de buena calidad (A+B) destacadamente superior al grupo 2, especialmente los vasectomizados con un 82.3%. Por otro lado el mayor porcentaje de embriones de peor calidad, tanto C como D es superior en el grupo 2.

Cuando lo analizamos en función del día de transferencia, se transfirieron en día +3 mayor porcentaje de embriones de buena calidad y en día +2 mayor porcentaje de embriones de peor calidad con respecto a día+3 en el grupo 1 (tabla II). No ocurre lo mismo en el grupo 2, en el que el porcentaje de embriones de buena calidad es similar (tabla II).

DISCUSIÓN

El presente estudio retrospectivo de casos y controles aporta datos de calidad embrionaria y de tasas de fecundación, implantación, embarazo clínico y nacidos vivos para comparar los resultados entre los grupos TESE-ICSI de parejas con azoospermia y parejas con OAT severa.

Varios trabajos citan (Liu, Bourne et al. 1997, De Croo, Van der Elst et al. 2000, Wood, Thomas et al. 2002) que la recuperación de espermatozoides de testículo combinada con ICSI consigue altas tasas de fecundación y embarazo, a pesar de que los espermatozoides testiculares presentan mayoritariamente movimiento esporádico y no progresivo. Se ha comprobado que se mantiene su potencial de fecundación, a diferencia de los espermatozoides de eyaculado, en el que la inmovilidad refleja una reducción de su potencial de fertilidad. Por otro lado, los resultados de fecundación mediante ICSI cuando se utiliza semen de eyaculado en casos de OAT severa son controvertidos; Strassburger et al. (Strassburger, Friedler et al. 2000) concluyeron que una baja concentración de espermatozoides tiene un efecto negativo en el resultado de ICSI. La causa es atribuida a la contaminación celular en el eyaculado y a la exposición de radicales libres de oxígeno (Li, Shang et al. 2004). A pesar de ello, en nuestro estudio las tasas de fecundación son similares tanto en el grupo 1 como en el grupo 2 (53.70% vs 53.98%) sugiriendo

	Tasa fecundación	Tasa fecundación anómala	Tasa implantación	Tasa embarazo	Tasa nacido vivo
Grupo 1	53,7%	6,6%	42,1%	43,5%	56,5%
Vasectomía	60,8%	10,4%	48%	57,3%	64,2%
Otros causas	46,1%	2,5%	30,7%	22,2%	44,4%
Día2			33,3%	35,9%	41,4%
Día3			63,6%	66,6%	100%
Grupo 2	53,9%	3%	16,6%	25%	20,8%
Día2			10,7%	17,6%	11,7%
Día3			28,6%	42,8%	42,8%

Tabla I: Tasa de fecundación, fecundación anómala, implantación, embarazo por transferencia y nacido vivo por transferencia en fresco del grupo 1 (vasectomizados y otras causas de azoospermia) y del grupo 2 (OAT severa). Ambos divididos también por día de transferencia +2 y +3.

	% A	% B	% A+B	%C	%D
Grupo 1	45,1	24,4	69,4	6,9	23,7
Vasectomizados	48,1	34,2	82,3	6,3	11,4
Otros causas	40,4	9,6	50	7,7	42,3
Día +2	43,6	19,2	62,8	7,7	29,5
Día +3	47,2	32,1	79,2	5,7	15,1
Grupo 2	26	26,8	52,8	38,2	8,9
Día +2	28,3	24,5	52,8	41,5	5,7
Día +3	24,3	28,6	52,8	35,7	11,5

Tabla II: Porcentaje de la calidad embrionaria en el grupo 1 (vasectomizados y azoospermicos) y en el grupo 2 con OAT severa. Ambos divididos también por día de transferencia +2 y +3.

que la fecundación no se ve afectada por el origen del espermatozoide.

Sin embargo, si observamos entre los diferentes subgrupos, la tasa de fecundación en pacientes TESE por vasectomía previa son muy superiores en comparación con los de otras causas de azoospermia y el grupo control. Esto es debido, probablemente a que estos pacientes no tienen alterada la capacidad de síntesis de espermatozoides. Por otro lado las tasas de fecundación en pacientes con OAT severa son algo superiores que en pacientes TESE azoospermicos (53.98% vs. 46.15%), hecho que se puede respaldar con la teoría de que los espermatozoides testiculares son menos maduros en comparación con los de eyaculado, ya que este proceso culmina en el epidídimo, afectando así a la capacidad de fecundar al ovocito maduro. También puede deberse a que los espermatozoides inmaduros se relacionan con la presencia de anomalías cromosómicas (Rodrigo, Rubio et al. 2004), lo que repercute en el proceso de fecundación normal.

Este hecho puede explicar también nuestros resultados de fecundación anómala, concretamente en los pacientes con azoospermia secundaria a vasectomía, donde la tasa de fecundación anómala es significativamente superior (10.40%) que en el resto de pacientes, lo que concuerda con la bibliografía consultada, ya que se ha detectado un discreto aumento en la tasa de aneuploidías en espermatozoides recuperados de testículo en pacientes con azoospermia obstructiva en comparación con los del epidídimo o eyaculados (Rodrigo, Rubio et al. 2004).

Estudios previos muestran que la prolongada estancia del espermatozoide en el epidídimo puede incrementar la presencia de puentes disulfuro entre las protaminas, existiendo un incremento en el tiempo de descondensación en los espermatozoides sobremadurados (Weng, Surrey et al. 2014). Además, se ha observado que el ADN de los espermatozoides extraídos del testículo tienen un grado de fragmentación significativamente menor. Esto se debe a que el material genético del espermatozoide puede dañarse por oxidación en su camino del testículo al

eyaculado. La fragmentación del ADN del espermatozoide puede afectar al desarrollo del embrión (efecto paterno tardío), lo que explicaría que las tasas de implantación, sean superiores en el grupo 1 (42.10%) con respecto al grupo 2 (16%).

Por otro lado las tasas de embarazo y de niños nacidos vivos también son superiores en el grupo 1 (43.47% y 56.50% respectivamente), comparado con el grupo 2 (25% y 20.8% respectivamente). Esta superioridad viene dada por los pacientes con vasectomía previa, debido a que en principio, no tienen ningún problema fisiológico que afecte a la calidad espermática. Sin embargo, el hecho de que la tasa de nacidos vivos sea tan superior en el grupo 1, se puede explicar por la alta tasa de embarazos gemelares obtenido en estos pacientes y a que la tasa de aborto fue superior en los pacientes con OAT severa, lo que indica que parejas con embriones de buena calidad deben ser candidatas a la transferencia de un solo embrión.

A diferencia de otros estudios (Greco, Scarselli et al. 2005) donde no mostraron diferencias en la morfología embrionaria, en nuestro estudio el porcentaje de embriones de calidad A es superior en espermatozoides testiculares independientemente de la causa de azoospermia. Quizá el paso de los espermatozoides por el tracto genital tenga una repercusión negativa, pudiéndose explicar por el efecto paterno temprano, donde el centrosoma del espermatozoide se encuentra directamente relacionado con el desarrollo temprano del embrión. Por tanto mientras el efecto paterno temprano influye en la morfología embrionaria, ésta no se ve afectada por el daño en el ADN espermático. Sin embargo, esta alteración del ADN, sí que parece quedar reflejada en la implantación embrionaria y como consecuencia en la probabilidad de embarazo.

La calidad embrionaria, las tasas de implantación, de embarazo, de nacidos vivos en las transferencias realizadas en día 3 son superiores, ya que se consigue una mejor selección embrionaria con mayor tiempo de cultivo.

Nuestros resultados pueden respaldar el hecho de que cuando el ADN está dañado, el espermatozoide puede fecundar el ovocito y dar lugar a embriones de buena apariencia morfológica, aunque fallarán más en la implantación y en el desarrollo una vez implantados (Greco, Scarselli et al. 2005).

Como conclusión, la técnica TESE- ICSI es un método eficaz para conseguir embriones de buena calidad en parejas con factor masculino por azoospermia y proporcionan buenos resultados en términos de embarazo. Sin embargo, estos resultados son similares a los obtenidos con espermatozoides de eyaculado cuando existe una alteración fisiológica en la síntesis o durante la eyaculación del semen.

BIBLIOGRAFIA

- Ben-Ami, I., A. Raziel, D. Strassburger, D. Komarovsky, R. Ron-El and S. Friedler (2013). „Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men.“ *Fertil Steril* 99(7): 1867-1871.
- Bendikson, K. A., Q. V. Neri, T. Takeuchi, M. Toschi, P. N. Schlegel, Z. Rosenwaks and G. D. Palermo (2008). „The outcome of intracytoplasmic sperm injection using occasional spermatozoa in the ejaculate of men with spermatogenic failure.“ *J Urol* 180(3): 1060-1064.
- Bolton, V. N., S. M. Hawes, C. T. Taylor and J. H. Parsons (1989). „Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst.“ *J In Vitro Fert Embryo Transf* 6(1): 30-35.
- De Croo, I., J. Van der Elst, K. Everaert, P. De Sutter and M. Dhont (2000). „Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and non-obstructive azoospermia.“ *Hum Reprod* 15(6): 1383-1388.
- Desai, N., F. AbdelHafez, E. Sabanegh and J. Goldfarb (2009). „Paternal effect on genomic activation, clinical pregnancy and live birth rate after ICSI with cryopreserved epididymal versus testicular spermatozoa.“ *Reprod Biol Endocrinol* 7: 142.

Greco, E., F. Scarselli, M. Iacobelli, L. Rienzi, F. Ubaldi, S. Ferrero, G. Franco, N. Anniballo, C. Mendoza and J. Tesarik (2005). „Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa.“ Hum Reprod 20(1): 226-230.

Li, K., X. Shang and Y. Chen (2004). „High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility.“ Clin Chim Acta 346(2): 199-203.

Liu, D. Y., H. Bourne and H. W. Baker (1997). „High fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection in patients with disordered zona pellucida-induced acrosome reaction.“ Fertil Steril 67(5): 955-958.

Palermo, G. D., L. T. Colombero and Z. Rosenwaks (1997). „The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development.“ Rev Reprod 2(1): 19-27.

Rodrigo, L., C. Rubio, E. Mateu, C. Simon, J. Remohi, A. Pellicer and M. Gil-Salom (2004). „Analysis of chromosomal abnormalities in testicular and epididymal spermatozoa from azoospermic ICSI patients by fluorescence in-situ hybridization.“ Hum Reprod 19(1): 118-123.

Strassburger, D., S. Friedler, A. Raziell, M. Schachter, E. Kasterstein and R. Ron-el (2000). „Very low sperm count affects the result of intracytoplasmic sperm injection.“ J Assist Reprod Genet 17(8): 431-436.

Terada, Y. (2007). „Functional analyses of the sperm centrosome in human reproduction: implications for assisted reproductive technique.“ Soc Reprod Fertil Suppl 63: 507-513.

Tesarik, J. (2005). „Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo.“ Reprod Biomed Online 10(3): 370-375.

Vanderzwalmen, P., A. Hiemer, P. Rubner, M. Bach, A. Neyer, A. Stecher, P. Uher, M. Zintz, B. Lejeune, S. Vanderzwalmen, G. Cassuto and N. H. Zech (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.

Weissman, A., E. Horowitz, A. Ravhon, H. Nahum, A. Golan and D. Levran (2008). „Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa.“ Reprod Biomed Online 17(5): 605-609.

Weng, S. P., M. W. Surrey, H. C. Danzer, D. L. Hill, P. C. Chen and T. C. Wu (2014). „Chromosome abnormalities in embryos derived from microsurgical epididymal sperm aspiration and testicular sperm extraction.“ Taiwan J Obstet Gynecol 53(2): 202-205.

Windt, M. L., K. Coetzee, T. F. Kruger, R. Menkveld and J. P. van der Merwe (2002). „Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia.“ J Assist Reprod Genet 19(2): 53-59.

Wood, S., K. Thomas, K. Schnauffer, S. Troup, C. Kingsland and I. Lewis-Jones (2002). „Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients.“ Fertil Steril 77(6): 1162-1166.

Wosnitzer, M., M. Goldstein and M. P. Hardy (2014). „Review of Azoospermia.“ Spermatogenesis 4: e28218.

Zhang, Q. F., J. Qiao, Q. Bai, M. Li, Y. Lian, Y. Q. Wu and P. Liu (2009). „[Outcome of intracytoplasmic sperm injection cycle: fresh compared to cryopreserved-thawed testicular and epididymal spermatozoa].“ Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 44(10): 740-744.



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

Con el **Seguro de Responsabilidad Civil Profesional** de Segurmec

Puedes contratar un **capital asegurado** de hasta **1.200.000 €**
Incluye **coberturas específicas** para nuestro colectivo tales como la **Garantía de Gametos y Preembriones** y la posibilidad de asegurar a las **Sociedades Profesionales** sin coste añadido

cmb
bizkaiko medikuen elkargoa
colegio de médicos de bizkaia
SEURMEC
ASEGURU-ARTEKARITZA S.M.
CORREDURÍA DE SEGUROS S.L.

ASEBIR Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción



HASTA

MESES GRATIS
EN TU SEGURO

Llama
91 327 89 92
O te llamamos
zurich.es/colegiosprofesionales

Llévate, durante todo el 2015, **3 meses gratis** al contratar y, si no tienes siniestros el primer año, **2 meses gratis** más en la primera renovación.

*Promoción válida para las nuevas pólizas de AUTO (exclusivamente turismos o furgonetas de uso particular) con la modalidad de Terceros Completo (Terceros + robo + lunas + incendio) o Todo Riesgo con Franquicia, pago anual y el tomador, conductor y/o propietario con al menos 5 años de carné, y HOGAR con las coberturas de continente y contenido, pago anual y que sean emitidas entre el 1 de noviembre de 2014 y el 31 de diciembre de 2015, ambos inclusive y con fecha de efecto (entrada en vigor) desde el 1 de noviembre de 2014 hasta el 31 de diciembre de 2015, ambos inclusive. En la contratación quedan excluidos de la promoción los reemplazos, es decir, los riesgos ya asegurados con Zurich Seguros en cualquiera de sus Canales de distribución. Promoción no acumulable a otras promociones y/o descuentos. Mecánica: Se devolverá al cliente el importe equivalente a 3 meses de prima del seguro contratado en el momento de la contratación y sólo si el cliente no declara ningún siniestro (cualquier suceso amparado en la póliza de seguros) en el primer año, se le devolverán otros dos meses de la prima del seguro contratado en el momento de la primera renovación. Los clientes que no cumplan este requisito sólo tendrán derecho a 3 meses gratis. La devolución se realizará mediante transferencia bancaria al cliente en un plazo máximo de 45 días desde la fecha de recibo liquidado. Para contratar y participar en la promoción llama al 91 327 89 92. Producto intermediado por SegurMec Correduría de Seguros, S.L. DGSFP J1281. El corredor recomienda estos productos sobre la base del análisis objetivo previsto en la Ley de Mediación de seguros y reaseguros privados. Estos productos pertenecen a Zurich Insurance plc, Sucursal en España.



CÉLULAS UNK EN LA INTERFAZ MATERNO-FETAL Y REGULACIÓN MEDIANTE INTERACCIONES KIR/HLA-C

UNK CELLS IN THE MATERNAL-FETAL INTERFACE AND REGULATION THROUGH KIR/HLA-C INTERACTIONS.

Juan Carlos Almazán Millaa, b. E-mail de contacto: juanalm2@alumni.uv.es

^aEstudiante de Postgrado Oficial en Instituto Valenciano de Infertilidad (Plaza de la Policía Local, 3. 46015, Valencia) y ^bembriólogo en prácticas en Instituto de Reproducción de la Marina Alta (Av. de Vergel, 10, 03778 Beniarbeig, Alicante)

Resumen: Desde las experiencias de Medawar sobre el ambiente en el embarazo, donde un organismo alogénico coexistía con la madre, la perspectiva inmunogenética ha evolucionado mucho. Desde la decidualización hasta la placentación, ocurren serios cambios estructurales, e interacciones de novo se producirán en la interfaz materno-fetal. El sistema inmune de la madre no parece sobre reaccionar contra el feto, y varios tipos celulares (incluyendo las NK uterinas) participan de esta modulación del sistema inmune. Sets específicos de genes polimórficos y poligénicos codificando para un sistema de receptor-ligando en primates superiores, denominados HLA (feto) y KIR (receptores de las NK uterinas), juegan un papel vital en el proceso de placentación. Se intenta dilucidar si la naturaleza de los diferentes contenidos haplotípicos tiene alguna relación con los resultados obstétricos.

Palabras clave: Células Asesinas Naturales, Placentación, Antígenos HLA-C, Receptores KIR, Complicaciones del Embarazo .

Abstract: Since Medawar experiences about the special scenario of pregnancy, where an allogenic organism was coexisting within mother's womb; immunomodulation has included nowadays new knowledge under immunogenetics perspective. From decidualization to placentation, several structural changes occur, and de novo interactions are exposed in the maternal-fetal interface. The mother's immune system does not appear to overreact against the fetus, and several cell types (including uNK cells) join in this modulation of immune response. Specific sets of polymorphic and polygenic sites codifying ligand and receptor in higher primates, namely HLA (fetal) and KIR (maternal uNK receptors) respectively; play a vital role in uNK controlled activation, and thus, in a successful pregnancy. Some authors studied the nature of the haplotypic content to unveil if there are any relationships with the obstetric results.

Key words: Azoospermia, Sperm Injections, Intracytoplasmic, ejaculated spermatozoa, testicular spermatozoa, pregnancy outcomes, embryo quality.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune (SI) materno no produce aloanticuerpos contra el feto alogénico, con lo que debería existir algún mecanismo para proteger al feto o crear tolerancia en este ambiente privilegiado.

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), llamado en humanos HLA por sus siglas anglosajonas *Human Leukocyte Antigens*, se acepta como la proteína de superficie altamente polimórfica capaz de generar la respuesta injerto-contra-huésped y el rechazo de injertos y trasplantes heterólogos. Los HLA de clase I son una familia de proteínas de vital importancia en la regulación del embarazo debido a su capacidad de interactuar con los *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors*

(KIRs). La revisión se focalizará en la función de las células NK uterinas (uNK o dNK indistintamente), una población diferenciada de las NK de sangre periférica (Parham et al., 2012). Aunque la función de las uNK es aún muy desconocida, se sabe que se localizan en gran número en la interfaz materno-fetal, y existen uniones ligando-receptor con el trofoblasto extravelloso (EVT). Se ha demostrado funcionalmente la capacidad de unión de HLA-C y KIR sobre su tejido diana *in vitro* (Hiby et al., 2010).

La desregulación en número o actividad de las uNK ha sido sugerida como una causa que puede conducir a fallo reproductivo, aunque el desconocimiento de su biología nos puede llevar a errores de concepto (Polanski et al., 2014). Discutiremos

algunas observaciones sobre los haplotipos HLA/KIR que pudiesen ayudar a asignar donantes en el laboratorio de FIV, o diagnosticar una incompatibilidad fundada, ya que parece haber alguna relación entre haplotipos y resultados obstétricos.

HLA FETAL EN EL FRENTE DE INVASIÓN

Las células NK de sangre periférica son citotóxicas: destruyen células que presentan antígenos mediante el HLA I, y además responden a patrones de expresión anormales de HLA y ausencia de éste ("missing self"). No obstante la población de uNK tiene otro papel.

Los genes de la cadena HLA- se localizan en el cromosoma 6 (3.6Mb, ≈260 genes). La región HLA clase I se compone de genes clásicos altamente polimórficos

La región *telB* del haplotipo KIR B protege ante desórdenes del embarazo, particularmente cuando el feto porta un gen *C2*.

Regiones KIR B maternas presentes ^A	Frecuencias genotipo KIR (%) en controles y afectados		Frecuencias KIR maternas (%) en embarazos con <i>C2</i> fetal		Frecuencias KIR maternas (%) sólo en embarazos con <i>C1</i> fetal	
	Controles (n=592)	Afectados (n=975)	Controles (n=235)	Afectados (n=513)	Controles (n=188)	Afectados (n=338)
Ninguna (KIR AA)	27.5	36.9 ^c	17.0	23.4 ^G	11.8	13.0
Sólo <i>cenB</i>	27.4	30.1	14.2	17.7	12.5	12.1
Sólo <i>telB</i>	19.3	14.6 ^D	11.1	9.4	8.7	6.4
<i>cenB</i> + <i>telB</i>	25.8	18.5 ^E	13.2	9.8	11.3	9.2
Ambas <i>telB</i> ^B	45.1	33.0 ^F	24.3	19.2 ^H	20.0	15.6
Análisis de tendencia	<i>P</i> <0.001		<i>P</i> <0.002		NS	

^ATodas las mujeres afectadas (Pre-eclampsia, RCF y AR) fueron agrupadas de acuerdo a si tenían algún gen del haplotipo KIR B en la región centromérica (*cenB*) y/o telomérica (*telB*). La frecuencia de estos genotipos KIR fue comparada en los embarazos control y afectados. ^BIncluye los grupos Sólo *telB* y Sólo *cenB* agrupados. La tendencia entre ningún gen KIR B (KIR AA) y la posesión de genes *telB* fue altamente significativa (*P*<0.001). Embarazos pre-eclámpticos y RCF fueron divididos en aquellos con un feto portador de al menos un gen *C2* y fetos de constitución *C1/C1*. La tendencia entre genotipo KIR AA y presencia de la región *telB* fue significativo (*P*<0.002) sólo cuando había un alelo *C2* presente en el feto. ^C*P*=1.3x10⁻⁴, OR 1.54 (1.23-1.92). ^D*P*=0.019, OR 0.71 (0.55-0.94). ^E*P*=7.4x10⁻⁴, OR 0.65 (0.51-0.83). ^F*P*=1.7x10⁻⁶, OR 0.60 (0.49-0.74). ^G*P*=0.01, OR 1.49 (1.10-2.01). ^H*P*=0.039, OR 0.74 (0.56-0.97).

(HLA-A, -B and -C), y 2 clústeres de genes no clásicos y no polimórficos (HLA-E, -F and -G) (Parham et al., 2012). Debido al mencionado polimorfismo, se puede encontrar un gran número de variantes alélicas (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Además los HLAs son poligénicos y se expresa tanto el alelo paterno como el materno en codominancia.

Los dominios reconocidos por los KIR se restringen a 4 epítomos de HLA de clase I (A3/11, Bw4, C1 y C2) localizados en el centro de la hélice del dominio α_1 abarcando los residuos 78-83. Estos epítomos son mutuamente exclusivos. En el embarazo los implicados son C1 y C2, siendo prácticamente los únicos que aparecen en humano (Parham et al., 2012). Dimorfismos en las posiciones 77 y 80 del dominio α_1 del HLA-C discriminan entre C1 (Ser⁷⁷, Asn⁸⁰) y C2 (Asn⁷⁷, Lys⁸⁰) (Chazara et al., 2011).

En la placentación hemocorial se observan los procesos de diferenciación del

endometrio en decidua (decidualización) y la remodelación de las arterias espirales uterinas (Ramathal et al., 2010). Las células uNK y el trofoblasto mantienen un diálogo molecular para que la placentación tenga una invasividad apropiada en el útero, asegurando así el flujo sanguíneo y por tanto el desarrollo y crecimiento fetal (figura 1).

En primates, el trofoblasto embrionario encuentra el SI materno en 2 áreas. Primero, la capa de sincitiotrofoblasto que recubre las vellosidades coriónicas y es bañada en sangre materna. Esta es inmunológicamente neutral, no expresando HLA. La otra área es donde el EVT se encuentra con la capa mucosa del útero. El EVT expresa una combinación

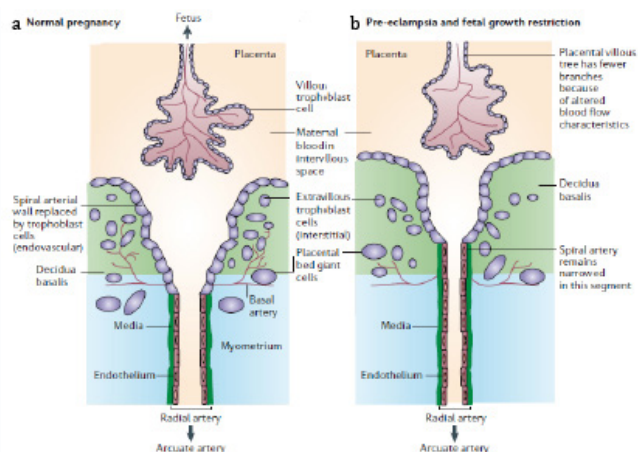


Figura 1. a) Embarazo normal. b) Pre-eclampsia: la invasión no es suficiente para garantizar el desarrollo del feto. Se puede ver cómo la remodelación de las arterias espirales no es completa y la reducida luz arterial no permite suficiente suministro de sangre materna (Moffett and Loke, 2006).

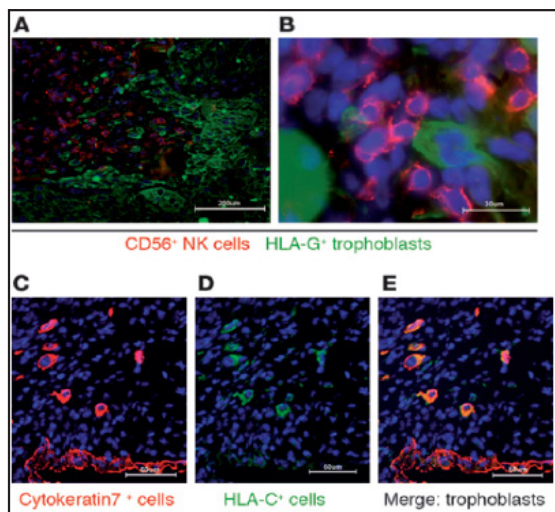


Figura 2. A-B) Células NK CD56+ (rojo) y células del EVT HLA-G+ (verde) C-D-E) Células uNK Citoqueratina7+ (rojo) y células del EVT HLA-C+ (verde). Tras la superposición se observan íntimamente asociadas (Hiby et al., 2010).

inusual de HLA-C,-E y-g. Ya que HLA-A y -B no se expresa, HLA-C es la única proteína de superficie presente con polimorfismo apreciable (Moffett and Loke, 2006).

La pre-eclampsia y el aborto recurrente (AR) podrían indicar una invasión insuficiente del trofoblasto embrionario, comprometiendo el desarrollo fetal (figura 1). En el otro extremo, una excesiva invasión produce el internamiento excesivo de la placenta en el útero, condición conocida como placenta percreta. Ambos son factores de riesgo materno-fetal mortal y este *trade-off* entre invasión y nutrición ha de regularse finamente (Trowsdale and Moffett 2008).

CÉLULAS UNK EN EL EMBARAZO Y KIRS POLIMÓRFICOS

Se ha demostrado la localización de estas uNK en la interfaz materno-fetal. Hyby y colaboradores (figura 2), usando anticuerpos, demostraron la íntima unión espacial entre las uNK (Citoqueratina7+, CD56+) y el EVT (HLA-C+, HLA-G+) (Hiby et al., 2010). Se propuso que durante el primer trimestre de embarazo, el 70% de las células blancas en la zona materna de la interfaz materno-fetal son células uNK, lo que fue ratificado en explantes de vellosidades coriónicas humanas de primer trimestre mediante inmunohistoquímica, análisis

morfométrico y recuento de densidad de uNK por unidad de área (Helige et al., 2014).

La localización y persistencia de estas uNK, con un fenotipo y función singular en la decidua humana durante el primer trimestre de gestación, nos sugiere que las uNK juegan un papel sustancial en la progresión del embarazo como resultado de una interacción con las células del EVT. De hecho se ha detectado la liberación de altas concentraciones de citoquinas y quimioquinas incluyendo: IL-8, VEGF, SDF-1 y IP-10, involucrados en la remodelación tisular, migración trofoblástica y neoangiogenesis en la placentación (Vacca et al., 2013).

Los receptores polimórficos KIR de las células uNK se unen a sus ligandos HLA de clase I para desencadenar la transducción de señal que lleva a su regulación y función.

Su nomenclatura se basa en el número de dominios extracelulares y la longitud de la cola citoplasmática. Los KIR inhibidores (iKIRs) tienen colas largas con presencia de motivos inhibidores basados en tirosina (ITIMs), que tras el reconocimiento KIR/KIR-Ligando (KIR-L) se fosforila y evita la respuesta de la célula uNK. Por otra parte los KIRs activadores (aKIRs) tienen un residuo positivamente cargado en la cola citoplasmática mediante el cual interactúa con DAP-12, adaptador de

señal con ITAM, motivo homólogo al ITIM pero con finalidad activadora sobre las respuestas de las uNK (Falco et al., 2013).

La familia génica de KIR (figura 3) se encuentra en el complejo receptor leucocitario (LRC) localizado en el cromosoma 19q13.4 y se heredan como haplotipos (Hsu et al., 2002). La diversidad en los KIRs humanos se debe a la variabilidad del contenido génico (poligenia) y el catálogo de formas alélicas (polimorfismo); al igual que ocurre con el HLA-C. *KIR3DL3* y *KIR3DL2* definen los extremos centromérico y telomérico, mientras que *KIR3DP1* y *KIR2DL4* se localizan centralmente. Estos genes se denominan genes de marco de trabajo y delimitan las regiones centroméricas y teloméricas (Falco et al., 2013). Las regiones pueden segregarse de manera independiente debido a la existencia de un punto de recombinación caracterizado recientemente entre *KIR2DL1* y *KIR2DL4* (Chazara et al., 2011).

Entre los 2 haplotipos caracterizados, se observa que los de tipo A son más constantes en su contenido y sólo presentan un aKIR: *KIR2DS4*. En cambio, los de tipo B son más variables en cuanto a número y combinación de aKIRs e iKIRs (Figura 3) (Falco et al., 2013). Los haplotipos existentes pueden ser *cenA/telA* (0-1 aKIRs), A/B (1-6 aKIRs) o *cenB/telB* (3-10 aKIRs). Los genes que codifican para los iKIRs son más polimórficos que los que codifican para aKIRs.

Con todo esto, dependiendo de los haplotipos, los genes que se expresan en los haplotipos, y las variantes alélicas del individuo determinan el nivel de activación/inhibición (modulación) de las células uNK. Esto nos sugiere de nuevo que ha de existir un equilibrio para no suprimir ni sobreestimar el aparato de invasión.

EXPERIENCIAS LLEVADAS A CABO (MATERIAL Y MÉTODOS)

Se han llevado a cabo varias experiencias bajo la hipótesis de que la composición haplotípica en un embarazo en circunstancias concretas

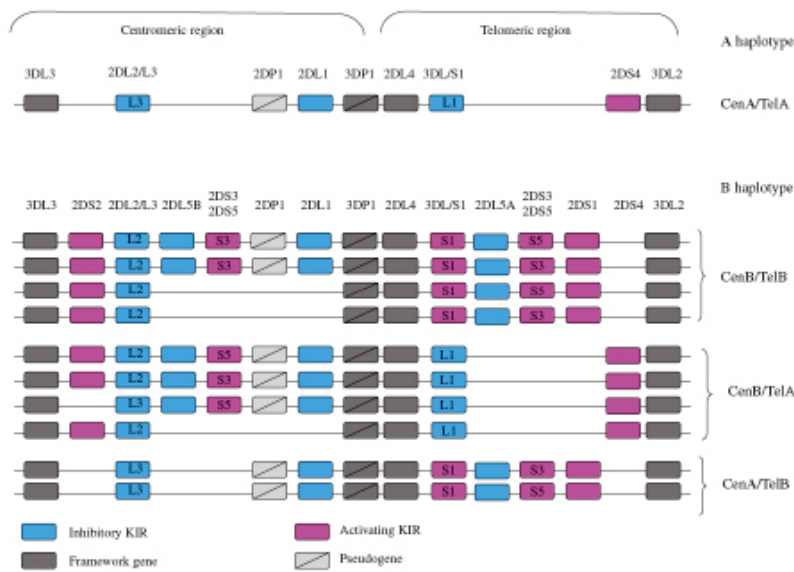


Figura 3. La región génica KIR se puede dividir entre telomérica y centromérica. Entre los diferentes haplotipos, se pueden observar las diferencias entre contenido activador e inhibidor. El haplotipo A, más constante, y B, más variable, se muestran en la figura. También se muestran diferentes combinaciones centroméricas y teloméricas (Cen/Tel) (Falco et al., 2013).

podría tener algún efecto sobre los resultados reproductivos (Hiby et al., 2010; Xiong et al., 2013; Alecsandru et al., 2014; Nakimuli et al., 2015).

Ya en 2010, Hiby y colegas analizaron las frecuencias de KIR AA en embarazos normales y afectados por los grandes síndromes obstétricos (GSO): Pre-eclampsia, restricción del crecimiento

fetal (RCF) y AR. Encontraron que el genotipo KIR AA es significativamente más frecuente en el grupo de afectados por GSO respecto al grupo control. En todas las cohortes afectadas, tanto madre como feto poseen altas dosis de HLA-C2. Esto sugiere un incremento del riesgo cuando la madre es KIR AA en presencia de HLA-C2 fetal. Pero hay todavía 2 factores que incrementan

el riesgo: C2 de origen paterno/desconocido (ovodonación o banco de semen) y la carga de C2, siendo mayor el riesgo en fetos C2/C2. Este defecto en la invasión placentaria puede deberse al alto efecto inhibitor de KIR AA y a la ausencia de aKIRs. El único aKIR en *telA* es *KIR2DS4*, que además no une todos los alotipos de C2 (Tabla I) (Hiby et al., 2010).

Alecsandru y colegas presentaron el primer trabajo mostrando diferencias en pacientes de técnicas de reproducción asistida (TRAs). Específicamente estudió si los haplotipos influenciaban los resultados reproductivos en las TRA considerando el número de embriones transferidos y el origen de los ovocitos. Cuando cruzaron todas las variables estadísticas se observaron las siguientes tendencias: 1. Las variables obstétricas de acuerdo a los haplotipos no arrojaban diferencias significativas. 2. Cuando se consideraba el número de embriones a transferir, se observó que el grupo con transferencia doble (DET) y haplotipo AA tienen unas tasas de aborto y aborto temprano incrementadas significativamente, y una tasa de recién nacido vivo (RNV) más baja comparada con DET AB y DET BB. 3. Dando un paso más, si se desglosaban los datos estadísticos con

La frecuencia del haplotipo materno KIR AA está aumentada en afectados comparados con los controles cuando el feto tiene mayor carga de C2 que la madre o cuando el C2 es heredado paternalmente.			
Parámetro	OR ^A	P	N (afectados/controles)
Efecto de la dosis relativa de genes C2 maternos y fetales			
Feto con menos genes C2 que la madre	0.97	1.00	177/75
Feto con mismo número de genes C2 que la madre	1.43	0.06	364/233
Fetos con más genes C2 que la madre	2.09 (1.24-3.51)	0.007	108/105
Efecto del origen de los genes C2 fetales			
Origen paterno	2.02 (1.14-3.58)	0.022	135/90
Origen materno	1.11	0.90	91/61

^ADonde se muestra, los valores entre paréntesis denotan intervalo de confianza del 95%. Los Odds Ratios (OR) y P-valores fueron calculados en base a la frecuencia relativa de haplotipos maternos KIR AA en controles y afectados.

Tabla I. Se muestra que la región *TelB* es protectora (tabla superior) y que el riesgo de padecer GSO era superior cuando el feto tenía 2 copias de C2; y si tenía sólo una, si era heredado del padre, el riesgo era aún superior (tabla inferior) (Hiby et al., 2010).

Haplotipo KIR	Ovocitos propios									Ovocitos donados								
	DET																	
	AA (N=79)			AB (N=138)			BB (=99)			AA (N=67)			AB (N=87)			BB (N=79)		
	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC
Embarazo	34	43.0	32.1-54.0	56	40.6	32.4-48.8	33	33.3	24.0-42.6	27	40.3	28.5-52.0	48	55.2	44.7-65.6	37	46.8	35.8-57.8
Aborto	28	35.4	24.9-46.0	40	29.0	21.4-36.5	22	22.2	14.0-30.4	22	32.8	21.6-44.1	25	28.7	19.2-38.2	20	25.3	15.7-34.9
Aborto temprano	18	22.8	13.5-32.0	23	16.7	10.4-22.9	11	11.1	4.9-17.3	11	16.4	7.5-25.3	10	11.5	4.8-18.2	6	7.6	1.7-13.4
Aborto clínico	10	12.7	5.3-20.0	17	12.3	6.8-17.8	11	11.1	4.9-17.3	5	16.4	7.5-25.3	15	17.2	9.3-25.2	14	17.7	9.3-26.1
RNV	6	7.6	1.7-13.4	16	11.6	6.2-16.9	11	11.1	4.9-17.3	5	7.5	1.2-13.8	23	26.4	17.2-37.5	17	21.5	12.4-30.6
Haplotipo KIR	SET																	
	AA (N=59)			AB (N=84)			BB (N=48)			AA (N=42)			AB (N=55)			BB (N=17)		
	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC	n	tasa%	95%IC
Embarazo	22	37.3	24.9-49.6	26	34.0	21.1-40.8	15	31.3	18.1-44.3	11	26.2	12.9-39.5	24	43.6	30.5-56.7	7	41.2	17.7-64.5
Aborto	12	20.3	10.1-30.6	18	21.4	12.6-30.2	10	20.8	9.3-32.3	6	14.3	3.7-24.8	11	20.0	9.4-30.6	5	29.4	7.7-51.0
Aborto temprano	6	10.2	2.4-17.9	8	9.5	3.2-15.8	6	12.5	3.1-21.8	3	7.1	-0.6-14.9	5	9.1	1.5-16.7	3	17.6	-0.4-35.7
Aborto clínico	6	10.2	2.4-17.9	10	11.9	5.0-18.8	4	8.3	0.5-16.1	3	7.1	-0.6-14.9	6	10.9	2.6-19.1	2	11.8	-3.5-27.0
RNV	10	16.9	7.4-26.5	8	9.5	3.2-15.8	5	10.4	1.7-19.0	5	11.9	2.1-21.7	13	23.6	12.4-34.8	2	11.8	-3.5-27.0

Tabla II. Mayores tasas de aborto temprano por ciclo se observan en transferencias dobles (DET) de pacientes con ovocitos propios en haplotipos AA, respecto a AB y BB. Los datos también sugieren una tasa de recién nacido vivo por ciclo significativamente menor tras DET con ovocitos de donante en gestantes con haplotipos AA, comparado con el resto (Alecsandru et al., 2014).

una variable más (origen ovocitos), se observan, primero mayores tasas de aborto por ciclo en pacientes DET AA con ovocitos propios comparado con los otros haplotipos; y segundo, tasas de RNV menores en DET AA donados, respecto a las otras constituciones haplotípicas (Tabla II) (Alecsandru et al., 2014). En este último caso puede deberse a la expresión de hasta 4 HLA-C desconocidos en el EVT, siendo desconocidos para la madre. Esto resulta en una mayor probabilidad de poseer HLA-C2 ajeno que en el SET, y lógicamente incrementándose en transferencias múltiples (Alecsandru et al., 2014). Coincide con las observaciones de Hiby (Hiby et al., 2010).

Diversos autores han observado que las frecuencias alélicas en diferentes poblaciones se pueden definir como una correlación inversa entre la proporción de haplotipos KIR AA y HLA-C2. El riesgo de GSO puede suponer una explicación para este proceso de balance génico. Japoneses y Coreanos con la mayor frecuencia de KIR AA, presentan la menor frecuencia de HLA-C2, mientras que en Aborígenes Australianos e Indios Asiáticos, la situación es la inversa (Alecsandru et al., 2014; Parham et al., 2012).

Nakimuli y colegas estudiaron los genes de los haplotipos KIR (AA, AB y BB) en mujeres ugandesas para detectar qué genes podían presentarse y en qué proporciones en embarazos control y pre-eclámpticos; de esta manera, intentan discernir si hay genes que tienden a tener efectos protectores ante la pre-eclampsia. Repiten la experiencia con mujeres del Reino Unido para así comprobar si los genes son los mismos o difieren a través de las poblaciones.

Cuando analizaron qué genes de KIR B eran protectores, encontraron 3 (*KIR2DL2*, *KIR2DL5* and *KIR2DS5*) que eran más frecuentes en el grupo control respecto al pre-eclámptico en Ugandesas. Efectos protectores equivalentes son atribuidos para el *KIR2DS1* en Inglesas. Enfatizan que *KIR2DS5* se localiza en la región cenB, mientras que *KIR2DS1* se localiza en la región telB. Finalmente nos sugieren que diferentes regiones del haplotipo KIR B protegen a las mujeres sub-Saharianas y a las Europeas de la pre-eclampsia, mientras que los haplotipos KIR AA son un genotipo de riesgo en ambas nacionalidades (Nakimuli et al., 2015). Estos resultados nos impulsan a conducir estudios haplotípicos a nivel de poblaciones humanas.

CONCLUSIONES

Aunque los GSO son multifactoriales, se observan ciertas tendencias de los resultados obstétricos en función de los haplotipos.

Dada la variabilidad entre poblaciones humanas, no debemos olvidar el estudio de las frecuencias alélicas y haplotípica. Diferentes genes tienen efectos protectores sobre las diferentes poblaciones.

Algunas observaciones son comunes a varios estudios: Presencia de haplotipos altamente inhibidores como KIR AA materno en presencia de HLA-C2 fetal de alta afinidad, incrementan el riesgo de GSO. El riesgo parece incrementarse en fetos cuyo C2 es de origen paterno o desconocido, y cuando la carga es mayor, como en fetos C2/C2 (homocigotos). También se observa que el riesgo de GSO incrementa en un DET de ovocitos donados debido al aumento probabilístico de encontrar más C2 desconocidos para la madre.

Lo previamente expuesto nos lleva a preguntarnos si implementar un tipaje KIR/HLA en las TRA podría ser una solución en los casos con sucesos repetidos de pre-eclampsia, RCF y AR.

Se podría sugerir mayor investigación en las frecuencias alélicas y la poligenia de estos loci, ya que diferentes alelos tienen diferente afinidad en las 2 partes implicadas (KIR y HLA). Las evidencias sugieren que los estudios deberían focalizarse en el tipaje de las diferentes poblaciones para trabajar con frecuencias alélicas estadísticamente conocidas para la asignación de donantes de similares o poco restrictivas características físicas.

Por otra parte, el tipaje de cada individual dependería de la relación coste-efectiva con la tecnología existente. No obstante, aunque pudiésemos tipar los progenitores (incluidos los donantes), al segregar aleatoriamente a sus gametos, no podríamos predecir con exactitud el contenido genético del feto. Además la recombinación génica complicaría estas predicciones.

Así pues el tipaje del progenitor, y el tipaje real del feto mediante biopsia en estudios prospectivos, nos puede dar una visión más amplia sobre lugares de recombinación y el comportamiento de la poligenia. Por último, se propone más estudio en el campo de la inmunogenética, las interacciones KIR/HLA, la poligenia de este sistema y sus frecuencias alélicas antes de poder desarrollar una aproximación rutinaria para interceder en el proceso de placentación.

BIBLIOGRAFÍA

Alecsandru D, Garrido N, Vicario JL, Barrio A, Aparicio P, Requena A and Garcia-Velasco JA. Maternal KIR haplotype influences live birth rate after double embryo transfer in IVF cycles in patients with recurrent miscarriages and implantation failure. *Hum Reprod* 2014;29:2637-2643.

Chazara O, Xiong S and Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol* 2011;90:703-716.

Falco M, Moretta L, Moretta A and Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications?. *Tissue Antigens* 2013;82:363-373.

Helige C, Ahammer H, Moser G, Hammer A, Dohr G, Huppertz B and Sedlmayr P. Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of

the trophoblast invasion front: a quantitative evaluation. *Hum Reprod* 2014;29:8-17.

Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Morgan L *et al.*, Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 2010;120:4102-4110.

Hsu KC, Chida S, Geraghty DE and Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.

Medawar P. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953;7:320-338.

Moffett A and Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 2006a;6:584-594.

Nakimuli A, Chazara O, Hiby SE, Farrell L, Tukwasibwe S, Jayaraman J, Traherne JA, Trowsdale J, Colucci F, Lougee E *et al.*, A KIR B centromeric region present in Africans but not Europeans protects pregnant women from pre-eclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015:.

Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG and Guethlein LA. Review: Immunogenetics of human placentation. *Placenta* 2012;33 Suppl:S71-80.

Polanski LT, Barbosa MA, Martins WP, Baumgarten MN, Campbell B, Brosens J, Quenby S and Raine-Fenning N. Interventions to improve reproductive outcomes in women with elevated natural killer cells undergoing assisted reproduction techniques: a systematic review of literature. *Hum Reprod* 2014a;29:65-75.

Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN and Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med* 2010;28:17-26.

Trowsdale J and Moffett A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin Immunol* 2008;20:317-320.

Vacca P, Mingari MC and Moretta L. Natural killer cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2013;97:14-19.

Xiong S, Sharkey AM, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O, Bauer J, Hiby SE, Colucci F and Moffett A. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J Clin Invest* 2013;123:4264-4272.

AGRADECIMIENTOS

A Diana Alecsandru y M^a José de los Santos (Instituto Valenciano de Infertilidad), por prestarme su tiempo y tutorizarme en mi TFM, del cual deriva este artículo; Isabel Mondéjar (Instituto de Reproducción de la Marina Alta), por discutir y valorar los contenidos de la revisión y Fernando Hernández (Instituto de Reproducción de la Marina Alta), por presentarme la posibilidad de publicar en Asebir.

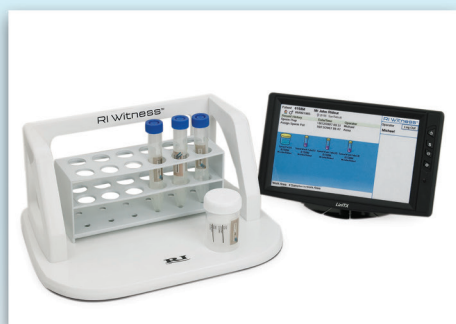
CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.



RI Witness™

**SISTEMA DE TRAZABILIDAD POR RADIOFRECUENCIA
GARANTIZA LA MÁXIMA SEGURIDAD EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA**



www.embiol.com



PRIMO VISION™

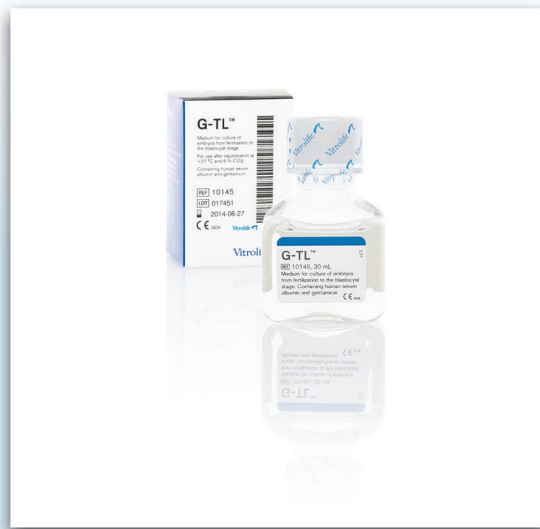
SISTEMA DE MONITORIZACIÓN MORFOCINÉTICA MODULAR
CON POSIBILIDAD DE OBSERVACIÓN EN TIEMPO REAL



Vitrolife 

G - TL

PRIMER MEDIO ÚNICO DISEÑADO
ESPECÍFICAMENTE PARA TIME-LAPSE



Vitrolife 

G - 185

INCUBADOR DE SOBREMESA CON CONCENTRACIONES
DE CO₂ Y O₂ PROGRAMABLES



- » 10 Posiciones de incubación y 1 de calentamiento
- » Recuperación inmediata de condiciones de cultivo
- » Software de control

SYSTEMS

KIVEX BIOTEC LTD

Micropipetas WALLACE

MICROPIPETAS PARA MICROMANIPULACIÓN



- » Amplia gama de modelos
- » Máxima calidad y precisión

wallace™

METABOLÓMICA DEL MEDIO DE CULTIVO EMBRIONARIO

METABOLOMIC OF EMBRYO CULTURE MEDIUM

A. García; C. Olmedo; N. Díaz; I. Cuevas

Unidad de Reproducción Humana. Hospital General Universitario de Valencia. anagarciabelda@gmail.com

Resumen: La necesidad de aumentar las tasas de embarazo e implantación y de reducir los riesgos materno-fetales que conllevan los embarazos múltiples producidos, muchas veces, tras un tratamiento de FIV, ha estimulado el estudio de nuevos procedimientos para la selección de los embriones óptimos para la transferencia. La clasificación embrionaria actual se basa, casi exclusivamente, en la observación de marcadores morfológicos, lo que resulta demasiado subjetivo. En el presente trabajo se revisa, como técnica emergente, la determinación del perfil metabolómico del medio de cultivo embrionario como método predictivo de viabilidad embrionaria, capaz de complementar a la evaluación morfológica y aportándole objetividad.

Palabras clave: Metabolómica, calidad embrionaria, gestación múltiple, implantación, medio de cultivo.

The need of increasing pregnancy and implantation rates and reduce maternal and fetal risks associated to multiple pregnancies after IVF treatment, has motivated the study of new tools for better embryo selection for transfer. Current embryo classification and selection is performed almost exclusively by using morphological markers, which are too subjective. The aim of this paper is to review as an emergent technique, the metabolomic profiling of embryo culture media as a predictive tool to assess embryo viability, to complement the morphological evaluation and to give objectiveness.

Key words: Metabolomics, embryo quality, multiple gestation, implantation, culture media.

INTRODUCCIÓN

Debido al aumento del número de tratamientos de reproducción asistida en las últimas décadas, se ha visto incrementada también la tasa de gestaciones múltiples. Este hecho se debe a que se tiende a aumentar el número de embriones a transferir para conseguir tasas de implantación y de gestación elevadas, muchas veces sin tener en cuenta el riesgo que conlleva una gestación múltiple, tanto para la madre como para el feto o recién nacido vivo.

Muchos países cuentan con una legislación que regula el número de embriones a transferir con el propósito de evitar las gestaciones múltiples. En España, son dos las agrupaciones científicas que se preocupan por la salud reproductiva: una es la SEF y otra la Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR). Ambas tienen grupos de interés centrados en el estudio del número de embriones que se deben transferir en cada caso dependiendo de las características de cada ciclo.

A pesar de ello, en España, según el último informe publicado por el Registro de la Sociedad Española de Fertilidad

referente al año 2011 (Prados et al, 2014), el 70.9% de las transferencias son de dos embriones y un 11.1%, de tres, resultando en unas tasas de gestación múltiple del 24.1% de gestaciones de dos sacos y 0.9% de tres o más.

La tendencia de los expertos en reproducción humana es transferir el mínimo número de embriones. Para ello es importante conocer qué embriones de la cohorte embrionaria de la paciente son los de mejor calidad, es decir, cuáles de ellos presentan mayor potencial de implantación.

Actualmente, los marcadores de calidad embrionaria a la hora de transferir son casi exclusivamente morfológicos. Se han ido estableciendo sistemas de clasificación de embriones basados en cualidades morfológicas de los mismos durante los primeros días de desarrollo (estadio de pronúcleos, día 2 y 3 de cultivo y estadio de blastocisto). Existen diversos estudios que establecen su clasificación basándose en características morfológicas diferentes dependiendo del día de desarrollo del embrión. Éstas fueron revisadas y se realizó una puesta en común por un grupo de expertos, dando lugar a la publicación del Consenso

de Estambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology 2011)

Sin embargo, la evaluación tradicional basada fundamentalmente en criterios morfológicos posee una serie de limitaciones asociadas a la metodología, la cual es altamente subjetiva y presenta un relativo poder predictivo y una gran variabilidad inter- e intra-observador que limita su valor.

Dadas las limitaciones de la valoración morfológica, la tendencia actual es encontrar, mediante el uso de nuevas metodologías, marcadores de viabilidad embrionaria, que, de una forma objetiva, puedan complementar la actual clasificación embrionaria.

La metabolómica se define como el análisis sistemático del total de metabolitos (pequeños biomarcadores moleculares) que representan el fenotipo funcional de un sistema vivo.

El metaboloma se refiere al total de pequeñas moléculas tales como los intermediarios metabólicos, ATP, ácidos grasos, glucosa, aminoácidos, colesterol, hormonas y otras moléculas

de señalización, así como metabolitos secundarios, que están presentes en una muestra biológica en un determinado momento. Estos compuestos son los últimos productos del metabolismo celular y son muy diferentes en cuanto a sus propiedades físicas y químicas. El conjunto de estos metabolitos cambia continuamente dependiendo de las rutas metabólicas que están actuando en cada momento en el interior de la célula. La metabolómica puede ofrecer una oportunidad única para investigar la relación entre el genotipo y el fenotipo ya que el metaboloma es el producto final de la expresión génica y, además, marca la relación entre la fisiología del organismo y las condiciones ambientales que lo rodean (Botros et al. 2008, Nagy et al. 2008).

Aplicando todo lo comentado hasta el momento en el campo de la reproducción humana asistida (RHA), podemos afirmar que, debido a que el metaboloma es cambiante y diferente para cada sistema biológico y cada situación dentro del mismo sistema, se podría utilizar la metabolómica en FIV con los siguientes objetivos (Nagy et al. 2008):

1. Ayudar a seleccionar el embrión o embriones de mayor viabilidad para maximizar las oportunidades de embarazo y aumentar la eficiencia de los tratamientos de FIV.
2. Seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación para evitar las gestaciones múltiples y los riesgos que éstas suponen.
3. Estimar la viabilidad general de la cohorte embrionaria y economizar las opciones dentro del ciclo de FIV: transferencia en fresco frente a transferencia en congelado, congelar o no congelar.
4. Selección de los gametos de mayor potencial para su uso en FIV.

Existen diversos estudios publicados en los que se evalúa el perfil metabolómico del medio de cultivo donde han crecido los embriones mediante diferentes metodologías y se busca la relación del mismo con el potencial de implantación de los embriones.

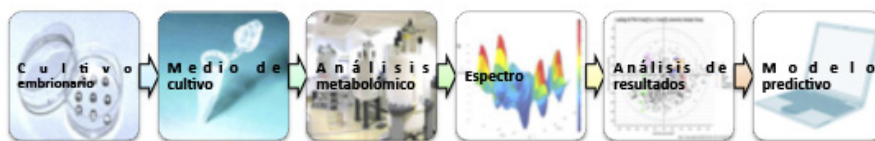


Figura 1. Análisis metabolómico del medio de cultivo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda de artículos publicados hasta Diciembre de 2014 en idioma inglés en las bases de datos PubMed y PMC del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con la finalidad de identificar los trabajos más relevantes en el estudio de la metabolómica del medio de cultivo embrionario en humanos y sus conclusiones.

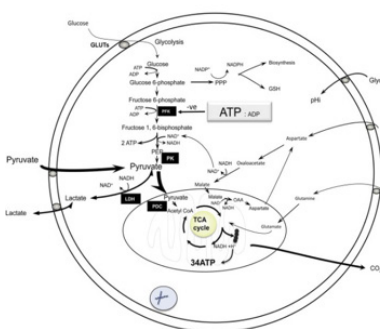
RESULTADOS

De los 76 resultados obtenidos en la búsqueda, se seleccionaron 17 artículos, entre los que se incluyen 3 trabajos originales, 6 revisiones bibliográficas y un meta análisis. Los motivos por los que algunos de los artículos derivados de la búsqueda se descartaron para la presente revisión fueron varios. Algunos presentaban trabajos realizados en animales, y el objetivo es analizar el estado actual en humanos. Otros artículos hacían referencia a otras técnicas no invasivas. La lectura de estos artículos llevó a la selección de aquellos más referenciados e importantes para completar la presente revisión.

DISCUSIÓN

Los primeros trabajos de metabolómica del medio de cultivo embrionario, fueron realizados por Hardy y colaboradores

(Figura 2)



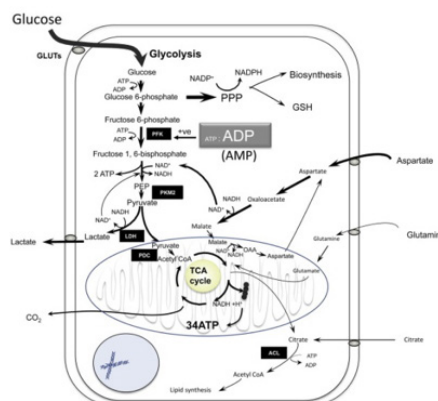
2.1. Embrión en división

(Gott et al. 1990). En las primeras etapas del desarrollo, hasta la activación genómica del preembrión, la principal fuente de energía embrionaria es la oxidación del piruvato, y en menor medida del lactato y de algunos aminoácidos. Cuando se comienza a formar el blastocisto, en cambio, la glicólisis se hace más importante para producir energía, pasando a ser la glucosa el carbohidrato más utilizado por el preembrión (Figura 2).

Figura 2.- Dinámica y regulación del metabolismo de embrión en división (2.1) y en estadio de blastocisto (2.2). Extraído de Gardner, 2013.

Si observamos los resultados de los trabajos publicados hasta hoy, a simple vista son algo incongruentes e incluso contradictorios (Tabla 1) (Uyar and Seli 2014). En el caso del piruvato, la mayoría de los autores encuentran que una mayor utilización del mismo se relaciona con desarrollo embrionario y en un caso con un consumo intermedio del mismo. Las tasas de implantación se ven mejoradas en un caso por consumo menor del mismo.

Con respecto al consumo de glucosa, los resultados parecen ser más coherentes y coincidentes, ya que se encuentra que no hay mayor consumo de glucosa en las primeras fases del desarrollo embrionario, pero que éste aumenta o se



2.2. Blastocisto

Study	Embryonic stage examined	Analyzed metabolite	Assessed outcome	Study population	Technology	Findings
Hardy et al (1989) ⁴²	Days 1-6	Pyruvate, glucose	Embryo and blastocyst development	25/43/73 (N _b /N _c /N _e)	Ultramicrofluorescence assay	↑ Pyruvate uptake on days 1-4 ∝ embryo development. ↔ Glucose uptake on days 1-4. ↑ Pyruvate and glucose uptake on day 5 ∝ blastocyst development.
Gottetal (1990) ³⁵	Days 2-6	Pyruvate, glucose, lactate	Blastocyst development	9/40 (N _b /N _c)	Ultramicrofluorescence assay	↑ Pyruvate uptake on days 2-4 ∝ embryo development. ↔ Glucose uptake on days 2-4. ↑ Pyruvate and glucose uptake on day 5 ∝ blastocyst development. ↑ Lactate production on days 3-5 ∝ blastocyst development.
Conaghan et al (1993) ³⁶	Days 2-3	Pyruvate	Implantation	42/173 (N _b /N _e)	Ultramicrofluorescence assay	↓ Pyruvate uptake ∝ implantation.
Turner et al (1994) ⁴³	Day 2	Pyruvate	Pregnancy	1 8/80 (N _b /N _e)	Ultramicrofluorescence assay	Morphologically good embryos were more likely to implant if they demonstrated an intermediate pyruvate uptake (10-30 pmol/embryo/h).
Gardner et al (2001) ³⁸	Days 4-6	Pyruvate, glucose	Blastocyst development and quality	25/43/60 (N _b /N _c /N _{pe})	Ultramicrofluorescence assay	↑ Pyruvate and glucose uptake on day 4 ∝ blastocyst development. ↑ Glucose uptake on days 5-6 ∝ blastocyst quality.
Houghton et al (2002) ⁴⁶	Days 2-3	18 Amino acids including glutamine, arginine, methionine, alanine, asparagine	Blastocyst development	14/42 (N _b /N _c)	High-performance liquid chromatography	↓ Glutamine, arginine, methionine uptake ∝ blastocyst development. ↓ Alanine and asparagine production ∝ blastocyst development.
	Compacting 8-cell	18 Amino acids including serine, alanine, glycine	Blastocyst development	23/55 (N _b /N _c)	High-performance liquid chromatography	↓ Serine uptake ∝ blastocyst development. ↓ Alanine and glycine release ∝ blastocyst development.
Brisson et al (2004) ⁴⁸	Day 2	Glycine, leucine, asparagine	Pregnancy, live birth	22/113/221 (N _b /N _e /N _e)	High-performance liquid chromatography	↑ Asparagine, ↓ Glycine and leucine ∝ pregnancy and live birth.
Sell et al (2008) ⁴⁹	Day 3	Glutamate	Pregnancy, live birth	17/34 (N _b /N _e)	Proton nuclear magnetic resonance	↑ Glutamate ∝ pregnancy and live birth.

Abbreviations: N_b, number of blastocysts; N_c, number of cycles; N_e, number of embryos; N_{et}, number of embryos transferred; N_i, number of embryos implanted; N_o, number of oocytes; N_p, number of patients; N_{pe}, number of pronucleate embryos.

Source: Adapted from Botros et al.⁴¹

mantiene al alcanzar la fase de mórula/blastocisto y se relaciona no sólo con la posibilidad de desarrollo embrionario, sino también con la calidad de los blastocistos.

Tabla 1. Resumen de los estudios que evalúan el metabolismo del embrión preimplantatorio como un indicador de la viabilidad reproductiva (Uyar and Seli 2014).

La producción de lactato parece aumentar conforme evoluciona el embrión, con lo cual puede considerarse un producto del metabolismo embrionario (glicólisis).

El metabolismo de los aminoácidos también ha sido ampliamente estudiado (tabla I), y tal y como ocurría con el metabolismo de los carbohidratos, los resultados no son concluyentes, ya que, según diferentes autores, existen discrepancias entre los aminoácidos responsables de que los embriones se desarrollen a blastocisto (glutamina, arginina, metionina, alanina) o que

implanten (asparagina, serina, glicina, glutamato), además de la forma en que lo hacen (depleción o aumento de los mismos). En la tabla I encontramos un resumen de las principales publicaciones al respecto (Uyar and Seli 2014).

Seli y colaboradores (Seli et al. 2008) observaron que los metabolitos que estaban participando en mayor medida en la variabilidad de su modelo eran la alanina (p=0,1), la glucosa (p=0,07), el glutamato (p=0,002), el lactato (p=0,2) la leucina e isoleucina (p=0,4) y el piruvato (p=0,1).

Nadal - Desbarats y colaboradores observaron diferencias cuantitativas en varios metabolitos entre los embriones que evolucionan a blastocisto y los que no, es decir, que modifican el medio de forma diferente. Los embriones que se bloqueaban en el desarrollo, consumían valina, treonina, lisina, metionina, tirosina, fenilalanina, acetato y glucosa, mientras que los mismos metabolitos eran generados por los embriones evolutivos. Ambos

grupos de embriones segregaban alanina, aunque en mayor cantidad en los embriones bloqueados. También vieron que los embriones bloqueados consumían mayor cantidad de piruvato y glutamato. A pesar de estas diferencias, al hacer el análisis principal de componentes para la creación de un modelo de llegada a blastocisto, éste tiene baja capacidad de predicción, y por lo tanto los autores concluyen que la técnica por sí misma no tiene utilidad como herramienta predictiva. Bien es cierto, que estos autores buscan una correlación con la llegada a estadio de blastocisto y no con la posibilidad de implantación (Nadal-Desbarats et al. 2013).

La correlación con la tasa de implantación por RMN (Resonancia Magnética Nuclear), fue analizada por Rinaudo y colaboradores (Rinaudo et al. 2012), de cuyo estudio concluyen que el modelo generado mediante RMN no tiene suficiente poder predictivo como para ser empleado para la selección de los embriones a transferir.

En el año 2010, Picton y colaboradores (Picton et al. 2010), mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia), encontraron diferencias de recambio de aminácidos entre embriones euploides y aneuploides, analizados por FISH (Hibridación *in situ* fluorescente) para los cromosomas 13, 18, 19, 21 X e Y. Encontraron diferencias estadísticamente significativas en los recambios de asparagina, glicina y valina entre medios de embriones euploides y aneuploides y diferencias casi significativas en cuanto a tirosina y lisina en días 2-3 de cultivo. Al avanzar el desarrollo (días 3-4 de cultivo), las diferencias se encontraban en los aminoácidos serina, leucina y lisina.

También mediante RMN, Sánchez – Ribas y colaboradores (Sanchez-Ribas et al. 2012) buscaron diferencias en los metabolomas de los embriones normales y con aneuploidías (trisomías y monosomías) del cromosoma 21, analizados éstos con técnicas de diagnóstico genético preimplantacional por hibridación *in situ* fluorescente para 9 cromosomas (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y). Estos autores concluyen que los medios de los embriones con trisomía 21 presentan niveles más bajos de isoleucina 1 que los de los embriones normales o con monosomía 21. En el mismo artículo, y con el mismo objetivo de encontrar diferencias metabólicas según el estado de ploidía del embrión, también se analizaron los medios de cultivo mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas, encontrando también diferencias significativas en cuatro metabolitos: caproato (ácido graso de cadena corta), androsterona sulfato y dos componentes no identificados (X-15622 y X-14808).

Una de las técnicas más conocidas para el análisis metabólico del medio de cultivo embrionario, es la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), ya que el uso de esta técnica y los datos retrospectivos que la avalaban (Seli et al. 2007), dio lugar al lanzamiento del Viametrics-E™. Este aparato es comercializado para el análisis metabólico del medio donde han crecido los embriones en cualquier laboratorio de embriología. Al introducir el medio de cultivo en el aparato, éste

reporta un score de viabilidad, basado en grupos funcionales biomarcadores de estrés oxidativo (-SH, -CH, -NH y -OH). Los scores se generan comparando regiones del perfil del espectro NIR de medios de cultivo que discriminan entre embriones que implantan y que no. Los trabajos realizados de forma retrospectiva dieron resultados positivos y encontraron una correlación entre el score de viabilidad y el potencial de implantación del embrión. Cuando se realizaron estudios randomizados prospectivos se encontró que el uso de Viametrics-E™ no mejoraba los resultados comparando con la selección embrionaria por morfología (Vergouw et al. 2014). Por lo tanto, aunque los resultados preliminares fueron muy alentadores, la comercialización del equipo no se llegó a generalizar por su falta de efectividad, además del encarecimiento adicional que suponía al propio tratamiento de reproducción asistida.

Las discrepancias observadas en los resultados obtenidos por cada grupo pueden ser debidas a la gran heterogeneidad en las variables introducidas en cada uno de los trabajos.

En primer lugar, cabe destacar que si la composición inicial de los medios de cultivos empleados es diferente, los resultados obtenidos también pueden cambiar (Gardner, 2013). Aunque las casas comerciales de medios de cultivo dan la composición cualitativa de los mismos y pueden parecer prácticamente iguales, la composición cuantitativa puede diferir mucho. Además, recientemente se ha publicado que los medios de cultivo comerciales contienen proteínas “no declaradas” (Dyrlund et al. 2014) que podrían afectar a diferentes vías metabólicas del embrión.

Otra variable que podría, claramente, interferir los resultados obtenidos por los diferentes grupos de trabajo son las condiciones de cultivo. El cultivo de los embriones para estudios de metabólica debe realizarse en todos los casos de forma individualizada. El volumen de medio en el que se cultivan los embriones, suele variar de unos laboratorios a otros y puede influir en los resultados, ya que los metabolitos

a analizar estarán más o menos diluidos en función del volumen de medio en el que crezcan.

Además, el cultivo o no en bajas presiones de oxígeno (5-6% vs 20%) puede hacer que los embriones realicen un consumo diferencial de nutrientes. Se ha demostrado que los embriones cultivados en una atmósfera oxidativa (20%) presentan un menor consumo de glucosa y un menor recambio de aminoácidos, lo que condiciona bajas tasas de evolución embrionaria y/o implantación (Gardner, 2013).

El día de recogida de los medios de cultivo a analizar, también va a condicionar los resultados obtenidos, principalmente si los medios pertenecen a cultivos pre o post activación genómica (Schultz 2002, Tadros et al. 2012). El proceso de activación genómica es gradual, y se caracteriza básicamente por la degradación progresiva de los mRNA maternos acumulados en el citoplasma y el aumento en los niveles tanto de transcripción de mRNAs de origen embrionario como en su traducción. Esta transición, requiere un aumento de la demanda energética del embrión. Por lo tanto, el momento en el que se hayan recopilado los medios de cultivo estará condicionando los metabolitos encontrados en el mismo y poniendo de manifiesto las rutas metabólicas utilizadas en ese momento puntual.

La técnica utilizada para la determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos también puede influir en los resultados que se obtienen. Cada aparato de espectroscopía ofrece diferente sensibilidad y especificidad, además de la variabilidad que puede sumar el procesamiento previo de la muestra a analizar. Por ejemplo, diluir o no la muestra con otros compuestos para su posterior análisis. Debemos tener en cuenta que trabajamos con microlitros de medio de cultivo, y que la introducción del más mínimo error en el proceso de pipeteado, puede hacer que las concentraciones finales de los metabolitos sean tan diferentes de los reales, que pueden traducirse en resultados diferentes de significancia o no de un determinado metabolito. Por tanto, el análisis y procesado de

la muestra, es fundamental que sea extremadamente preciso.

CONCLUSIÓN

Con el fin de poder utilizar la metabolómica como herramienta complementaria a la morfología para la selección embrionaria, son necesarios más estudios en los que se incluyan otras variables relacionadas con el proceso reproductivo, validados posteriormente con estudios prospectivos randomizados. Además es necesaria la unificación de variables para la realización de los mismos y la utilización de tecnologías con mayor sensibilidad que las aplicadas.

A pesar de que con los resultados obtenidos hasta la fecha no se ha logrado encontrar una metodología que cumpla todos los requisitos que debería tener una buena herramienta diagnóstica para su utilización rutinaria en los laboratorios, todos los trabajos que se están realizando están llevando a una mejor comprensión del metabolismo embrionario.

BIBLIOGRAFÍA

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270-1283.

Botros L, Sakkas D and Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;14:679-690.

Dyrlund TF, Kirkegaard K, Poulsen ET, Sanggaard KW, Hindkjaer JJ, Kjems J, Enghild JJ and Ingerslev HJ. Unconditioned commercial embryo culture media contain a large variety of non-declared proteins: a comprehensive proteomics analysis. *Hum Reprod* 2014;29:2421-2430.

Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril*. 2013; 99;4: 1062-72.

Gott AL, Hardy K, Winston RM and Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1990;5:104-108.

Nadal-Desbarats L, Veau S, Blasco H, Emond P, Royere D, Andres CR and Guerif F. Is NMR metabolic profiling of spent embryo culture media useful to assist in vitro human embryo selection?. *MAGMA* 2013;26:193-202.

Nagy ZP, Sakkas D and Behr B. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reprod Biomed Online* 2008;17:502-507.

Picton HM, Elder K, Houghton FD, Hawkhead JA, Rutherford AJ, Hogg JE, Leese HJ and Harris SE. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. *Mol Hum Reprod* 2010;16:557-569.

Prados F, Vidal E, Hernández J, et al. Registro de fecundación in vitro e inyección espermática intracitoplasmática de la Sociedad Española de Fertilidad de los años 2010 y 2011. *MEDRE*. 2014;01:33-42.

Rinaudo P, Shen S, Hua J, Qian S, Prabhu U, Garcia E, Cedars M, Sukumaran D, Szyperski T and Andrews C. (1)H NMR based profiling of spent culture media cannot predict success of implantation for day 3 human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1435-1442.

Sanchez-Ribas I, Riqueros M, Vime P, Puchades-Carrasco L, Jonsson T, Pineda-Lucena A, Ballesteros A, Dominguez F and Simon C. Differential metabolic profiling of non-pure trisomy 21 human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2012;98:1157-64.e1-2.

Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2002;8:323-331.

Seli E, Botros L, Sakkas D and Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;90:2183-2189.

Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM and Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy

correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007;88:1350-1357.

Tadros AS, Castillo EM, Chan TC, Jensen AM, Patel E, Watts K and Dunford JV. Effects of an emergency medical services-based resource access program on frequent users of health services. *Prehosp Emerg Care* 2012;16:541-547.

Uyar A and Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med* 2014;32:141-152.

Vergouw CG, Heymans MW, Hardarson T, Sfontouris IA, Economou KA, Ahlstrom A, Rogberg L, Lainas TG, Sakkas D, Kieslinger DC et al. No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod* 2014;29

¿DEBEMOS REALIZAR MÁS PRUEBAS GENÉTICAS A LOS DONANTES DE EMBRIONES?

MUST WE MAKE MORE GENETIC TESTING TO THE EMBRYO DONORS?

María Fernández Díaz ^{1*}, Sara Atienza de Nava ¹, Begoña Arnott Fernández ¹, Ignacio Arnott Fernández ¹, Abel Gayo Lana. ¹FIV4 Instituto de Reproducción Humana * m.fernandez@fiv4.es

Resumen: El número de tratamientos con donación de gametos/embriones está aumentando en nuestro país año tras año. A pesar de ello, la legislación no indica qué pruebas realizar a los donantes más allá de las serologías, y tampoco las guías de buena práctica clínica son claras al respecto. El objetivo de esta revisión ha sido evidenciar el vacío legal existente y sus consecuencias, todo a raíz de la aparición de una zona gris del X-frágil en la primera donante de embriones de nuestra clínica.

Palabras clave: síndrome X-frágil, donación de gametos, donación de embriones, legislación, recomendaciones, salud genética.

Abstract: The number of treatments with oocyte and embryo donations is increasing in our country every year. However, the legislation does not indicate which tests to perform on donors, beyond serology, neither the guidelines for good clinical practice are clear about it. The objective of this review was to highlight the existence of a loophole and its consequence after the appearance of a gray area of the X-fragile in the first embryo donor in our clinic.

Key words: fragile X syndrome, gamete donation, embryo donation, legislation, guidelines, genetic health.

INTRODUCCIÓN

Según datos del registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), el porcentaje de ciclos de ovodonación que se realizaron en nuestro país en el año 2002 fue del 12,3%, dato que aumentó hasta el 19,0% según el último registro publicado de 2012.

Las pacientes que recurren a ciclos de ovodonación o de adopción de embriones, lo hacen, entre otras causas, por alteraciones genéticas que impiden o dificultan que tengan descendencia sana propia. Por ello, una vez aceptado que el embrión no será genéticamente suyo, sí que demandan que al menos tengan cierta seguridad genética y se eviten en la medida de lo posible aquellas enfermedades que puedan ser transmisibles a la descendencia.

Una de las pruebas genéticas realizables es el síndrome X-frágil, que constituye un trastorno genético neurodegenerativo complejo e intratable que sigue un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X. Se debe a la expansión del triplete CGG en la región promotora del exón 1 del gen FMR1 (locus Xq27.3) que en más de 200 repeticiones altera la expresión del gen FMR1 mediante un proceso de metilación, y por tanto la ausencia en la síntesis de la proteína FMRP (Muzar Z, et al., 2014).

Es la segunda causa de retraso mental de origen genético tras el síndrome de Down y, aunque la frecuencia de la mutación no es bien conocida, ronda entre 1/4000 en varones y 1/8000 en mujeres. Sin embargo, la frecuencia de premutación es de 1:259 a 1:382, y la de portadores de repeticiones en la zona gris de 1:143 en la población general (Rousseau F, et al., 1995; Cronister A, et al., 2005).

La región con repeticiones CGG se clasifica en cuatro grupos basándose en el número de repeticiones del triplete: normal (de 6 a 44 repeticiones), intermedio o zona gris (de 45 a 54 repeticiones), premutación (de 55 a 200

repeticiones) y mutación completa (más de 200 repeticiones) (figura 1).

El triplete CGG es propenso a la expansión durante la transmisión de padres a hijos (Fu YH, et al., 1991), sin embargo, cuando las expansiones se producen en regiones no codificantes (como es el caso del síndrome del X-frágil) las transmisiones inestables se inician desde alelos premutados, produciéndose un aumento en el número de este triplete de generación en generación, fenómeno conocido como anticipación (Mirkin SM, et al., 2007; KovtunIv et al., 2008).

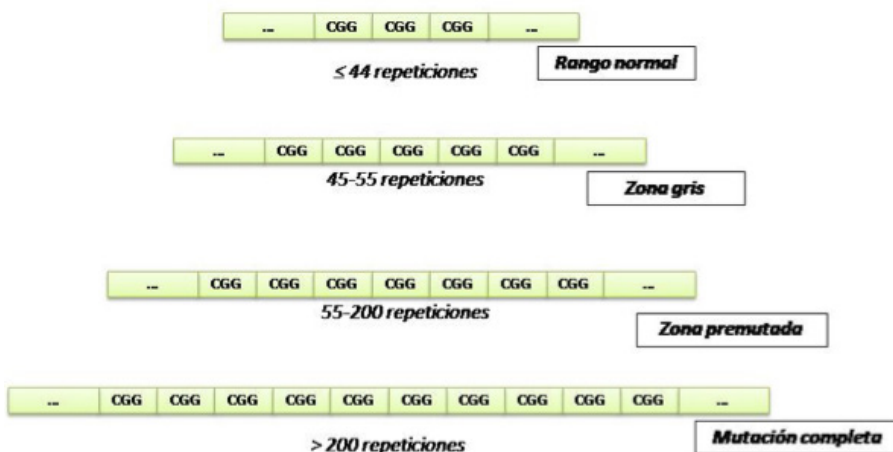


Figura 1: número de repeticiones que presentan cada rango del X-frágil.

DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES

La ley que regula estos procesos de donación tiene una interpretación que puede resultar ambigua y poco clara a la hora de indicar las pruebas a realizar en donantes de gametos y embriones. En el capítulo II de la ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción asistida, dice que se han de cumplir las “condiciones clínicas y determinaciones analíticas necesarias para demostrar [...] que los

donantes no padecen enfermedades genéticas hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia”. Pero, ¿qué tipo de pruebas genéticas se han de aplicar? En ninguna parte están especificadas.

Si acudimos al Real Decreto 412/1996 de 1 de marzo por el que se establecen los protocolos obligatorios de estudio de los donantes y usuarios relacionados con las TRHA, en el

artículo 6 dice: “serán excluidos como donantes los que presenten enfermedades genéticas, hereditarias o congénitas transmisibles”, pero de nuevo no especifica cuáles. En cuanto a los donantes de preembriones, indica realizar una historia clínica con inclusión de antecedentes personales y familiares, descartándose como donantes aquellos que hayan tenido un hijo con cromosopatías o una serie de enfermedades hereditarias, pero en

SEF (Matorras 2007)		
Donantes semen	Donante óvulos	Donantes embriones
Historia familiar y personal	Historia familiar y personal	¿?
Cariotipo	Cariotipo	
Fibrosis quística (conveniente)	Fibrosis quística (conveniente)	
Estudio hematológico completo para descartar B-talasemias	Otros estudios dependiendo del estatus del cónyuge de la receptora	
Donantes con ancestros del Este de Europa descartar Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher y X-frágil	Estudio hematológico completo para descartar B-talasemias	
	Donantes con ancestros del Este de Europa descartar Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher y X-frágil	
Guidelines ESHRE		
Donantes semen	Donante óvulos	Donantes embriones
Historia familiar y personal		
Cariotipo		
Estudio de enfermedades prevalentes según la etnia		
Guidelines UK (2008)		
Donantes semen	Donante óvulos	Donantes embriones
Historia clínica genética personal y familiar		
Cariotipo		
Fibrosis quística en caucásicos		
Talasemia en mediterráneos		
Recomendaciones ASRM (2008)		
Donantes semen	Donante óvulos	Donantes embriones
Fibrosis quística	Fibrosis quística	Historia familiar y genética
No necesario cariotipo	No necesario cariotipo	
	No necesario X-frágil	

Tabla 1: resumen de las recomendaciones de diferentes asociaciones científicas acerca de los donantes de gametos y embriones.

ningún caso habla de si los progenitores son los portadores.

Si acudimos a la normativa europea (Directiva 2006/17/CE de la comisión de 8 de febrero de 2006) por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos y técnicas para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos, se especifican las pruebas de laboratorio necesarias para los donantes de células y tejidos, haciendo referencia únicamente a las enfermedades infecciosas pero no a las de origen genético.

Como vemos, la ley no es concreta, y además hay que tener en cuenta que tiene un carácter temporal. Por ello, en medicina se recurre a recomendaciones profesionales que sí se van actualizando de manera paralela a los avances científicos.

ESHRE no hace referencia a estudios genéticos requeridos para la donación de embriones y gametos en sus *guidelines*, aunque sí hace alusión a todas las enfermedades de origen infeccioso, y requiere una búsqueda de enfermedades de origen genético recesivo que se conozcan prevalentes según el origen étnico del donante. Su grupo de interés sobre ética y legislación indica en el apartado de reclutamiento y cribado de donante, que es necesario dicho cribado para proteger al receptor y al futuro niño, aunque posteriormente solo especifica la edad máxima de los donantes de gametos.

ASRM recomienda el análisis de fibrosis quística y no considera necesario ni el cariotipo ni el X-frágil en los donantes de gametos. Sin embargo, en su apéndice A, indica no aceptar donantes con alteraciones mendelianas (autosómica dominante o ligada al X) como Corea de Huntington u homocigotos para enfermedades recesiva, mientras que si son heterocigotos, no necesariamente deben ser excluirlos del programa. Más adelante especifica que no sean portadores de ninguna malformación importante, ni con existencia de enfermedad genética en la historia familiar, ni tampoco portador de anomalías del cariotipo (a pesar de haber dicho que no era necesario). En el caso del X-frágil, lo dejan a elección del centro. Pero nuevamente, los donantes de gametos quedan menos especificados, reduciéndose a una historia familiar y genética.

Tanto en ASEBIR como en AEGH (Asociación Española de Genética Humana) no se encuentra información relevante más allá de la ley. Sin embargo, desde la SEF se han realizado recomendaciones a la hora de seleccionar donantes que incluyen la historia familiar y personal, el cariotipo, y la conveniencia de realizar otras pruebas según el origen étnico del donante. Sin embargo, respecto a los donantes de embriones no especifica nada concreto (tabla 1).

Quizás sería el Reglamento de donantes el lugar en el que encontrar datos más concretos sobre las pruebas obligatorias

a realizar. En este instrumento normativo se hace referencia a los criterios de aplicación, donde no se incluye, en principio, como obligatoria ninguna prueba genética, limitándose a manifestar sobre este aspecto que “se llevará a cabo una evaluación de la carga genética en relación a la existencia de genes autosómicos recesivos de acuerdo con el conocimiento científico y la prevalencia conocida en la etnia de la donante.” (Fernando Abellan 2009)

Intentando sacar conclusiones tras analizar la legislación y las recomendaciones, podemos decir que no existe obligación por parte de los centros de realizar más análisis a sus donantes que los correspondientes a enfermedades infecciosas. En cuanto a estudios genéticos, por lo general se recomienda realizar aquellas pruebas que sean más prevalentes en el territorio donde nos encontremos. Pero, ¿dónde está el límite de seguridad? En la tabla 2 se indican las prevalencias de portadores de algunas de las enfermedades debatidas.

En el caso de donantes de embriones sobrantes de ciclos FIV, la donación se realiza, por lo general, transcurridos varios años desde que se generaron, cuando la pareja ya ha cumplido su deseo reproductivo. De rutina no se hacen las pruebas genéticas de las que hemos hablado anteriormente, pero cuando esos embriones van a ser donados con fines reproductivos, hemos visto que se recomienda completar los estudios genéticos.

Patología	Prevalencia de portadores	Patología	Prevalencia de portadores
B-talasemia (mediterráneos)	1:7	Atrofia muscular espinal (gen SMN1) (ascendientes caucásicos)	1:40-1:60
Tay-Sachs (ascendientes franco canadienses)	1:13	Alfa-1-antitripsina (gen Serpina 1) (ascendientes caucásicos)	1:43
Hemocromatosis hereditaria (caucásicos)	1:10	X-frágil (ascendientes caucásicos)	1:77
Factor V de Leiden	1:14	Alfa-talasemia (mediterráneos)	1:250
Fibrosis quística (ascendientes caucásicos)	1:25		

Tabla 2: algunas de las enfermedades con mayor prevalencia de portadores

Para ello hay que llamar a la pareja progenitora y pedirles que acudan de nuevo a la clínica para una extracción sanguínea y posterior cita para consejo genético. En muchas ocasiones, esa llamada conlleva un cambio en sus planes, y hace que muchas parejas se echen atrás en la donación o directamente no acudan nunca a hacer el análisis. ¿Debemos entonces descartar los embriones donados por estas parejas?

Una opción para evitar que los donantes de embriones desistan en la donación, sería tener accesible su ADN sin necesidad de una nueva extracción. A priori la solución podría ser un biobanco que según la ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007 de 3 de Julio) se define como un establecimiento público o privado, sin ánimo de lucro, que acoge una colección de muestras biológicas concebida con fines diagnósticos o de investigación biomédica.

Alejándonos de la función puramente investigadora de los biobancos habituales, otra función interesante es la de custodia de material biológico procedentes de donantes de gametos (o incluso de pacientes FIV que así lo autoricen) para usarlo no solo en proyectos de investigación, sino en futuros procesos diagnósticos sin necesidad de tener que acudir al donante.

La motivación que nos llevó desde FIV4 al análisis de la legislación vigente fue la aparición de una zona gris del X-frágil en la primera donación de embriones que tuvimos en nuestra clínica. La pareja, que cumplía todos los requisitos legales para dar su embrión en adopción, acudió a la clínica, aunque no sin ciertas trabas motivadas por el nuevo desplazamiento, para ampliar los estudios, entre otros X-frágil.

La razón por la que decidimos ampliar estos estudios no exigidos por la ley fue, aparte de por una mejora en el sistema de calidad, por una apuesta por garantizar cierta "salud genética" en la descendencia hasta donde la ciencia alcanza a día de hoy, por cuestiones éticas y por la propia demanda de los pacientes, además de seguir las indicaciones de la ley 14/2006 para

garantizar que los donantes no padecen enfermedades genéticas hereditarias.

Si bien es cierto que esto nos llevaría a la realización de una lista de pruebas posiblemente interminable, creemos que se deben balancear aquellos estudios que "podemos" hacer, frente a los que "debemos" hacer, teniendo en cuenta criterios científicos de prevalencia de enfermedades y portadores, así como la gravedad de poseer un cambio genético en la salud del portador (Soini S. et al., 2006).

El hecho de que no esté claramente regulada la batería de pruebas a realizar, y que tampoco exista consenso entre las guías de buena práctica clínica, hace que haya una amplia variabilidad entre centros de nuestro país y esto dificulta el flujo constante y habitual de gametos y embriones entre las diferentes clínicas.

En los casos en que los gametos o embriones procedan de centros ajenos, ya que no todos realizan los mismos análisis, tendremos que dar a elegir gametos/embriones con más o menos análisis hechos. ¿Debe tener el mismo coste para el paciente un tratamiento de recepción de gametos/embriones con más o menos análisis realizados a los progenitores? ¿Qué actitud toman los pacientes ante esta variabilidad?

Esta cuestión económica es la que en muchos casos pesa a la hora de hacer o no ciertas pruebas genéticas a los donantes. Aunque son pruebas relativamente caras, hay que destacar que la amortización es tanto mayor cuantos más embriones se donen y cuantos más ciclos de donación de gametos realice un donante. Además, si tenemos en cuenta que la prueba genética más ampliamente realizada es el cariotipo a pesar de encontrarse alterado solamente en el 0,6-0,7% de donantes con historia y fenotipo normal, ¿por qué no realizar otras pruebas genéticas con incidencias mayores y en muchos casos asociados a enfermedades graves?

Las conclusiones a las que llegamos son básicamente que debido al vacío legal en cuanto a las pruebas genéticas necesarias para llevar a cabo un programa de

donación de gametos/embriones, existe una elevada variabilidad entre clínicas y por tanto entre calidad genética en la donación, hecho éste que no debería existir.

BIBLIOGRAFÍA

Cronister A, DiMaio M, Mahoney MJ, Donnenfeld AE, Hallam S. Fragile X syndrome carrier screening in the prenatal genetic counseling setting. *Genet Med*. 2005 Apr;7(4):246-50

Fernando Abellan, Javier Sánchez-Caro. *Bioética y Ley en Reproducción Humana Asistida, Manual de casos*. 2009 p. 83-106.

FU YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991 Dec 20;67(6):1047-58

Kovtum IV, McMurray CT. Features of trinucleotide repeat instability in vivo. *Cell Res*. 2008 Jan;18(1):198-213

Matorras R. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Fertilidad*. 2007.

Mirkin SM. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 2007 Jun 21;447(7147):932-40

Muzar Z, Lozano R. Current research, diagnosis, and treatment of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Intractable Rare Dis Res* 2014 Nov;3(4):101-9

Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, Khandjian EW, Morgan K. Prevalence of carriers of permutation-size alleles of the FMR1 gene and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. 1995 Nov;57(5):1006-18

Soini S, Ibarreta D, Anastasiadou V, Aymé S, Braga S, Cornel M, et al. The interface between assisted reproductive technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. *Eur J Hum Genet*. 2006 May;14(5):588-645

Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, McConkie-Rosell A, Welt CK, Rebar RW, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):456-65.

ANÁLISIS DE POSIBLES INDICADORES DE TASA DE OBTENCIÓN DE BLASTOCISTOS: EDAD MATERNA, BAJA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO Y TIME LAPSE.

POSSIBLE INDICATORS FOR BLASTOCYST FORMATION RATE: MATERNAL AGE, LOW OXYGEN CONCENTRATION AND TIME LAPSE.

Olga Hortala, Aïda Casanovasa. Unitat d'Endocrinologia Ginecològica. Calle Bisbe Torras i Bages, 4. Bajos. 08500. Vic. hortalogla@gmail.com a Unitat d'Endocrinologia Ginecològica (UEG). 08500 Vic, Barcelona.

Resumen: Buscar formas de optimizar el cultivo de los embriones y sus criterios de selección han despertado, desde siempre, un gran interés en el colectivo científico. Más aún desde que la transferencia de un único embrión (eSET, del inglés Elective Single Embryo Transfer) ha cobrado relevancia. Mediante un estudio retrospectivo con datos de nuestro centro, nos propusimos abordar estos temas a partir de tres aproximaciones distintas: determinar si la edad de nuestras pacientes afectaba al desarrollo embrionario valorando el porcentaje de blastocistos obtenidos por ciclo; si la concentración de oxígeno afectaba al cultivo embrionario y si el tiempo en que los embriones tardaban en hacer la primera división mitótica podía ser un buen indicador de llegada a blastocisto. Aunque no todas nuestras hipótesis han sido estadísticamente significativas, sí que muestran una tendencia a ello y, por tanto, es un claro indicativo que debemos considerar el presente como un estudio preliminar. Es necesario recopilar más datos para confirmar nuestras hipótesis.

Palabras clave: Concentración de oxígeno, cultivo embrionario, time lapse, blastocisto, edad materna.

Abstract: Looking for new ways or strategies to optimize embryo culture and its selection criteria has always aroused great interest in the scientific collective, which increased since the Elective Single Embryo Transfer (eSET) became popular. This is a retrospective study with data from our centre. We wanted to determine whether our patients' maternal age affects embryo development assessing the percentage of blastocysts obtained per cycle; whether oxygen concentration affects blastocyst formation rate and if the time that embryos take to perform the first mitotic division is a good indicator of blastocyst development. Despite the lack of statistical significance of some of our hypotheses, they show a tendency to it and, therefore, it is a clear indicator that we must consider this study as preliminary and extend the study to a larger population.

Key words: Oxygen concentration, embryo culture, time-lapse, blastocyst, maternal age.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un debate abierto sobre la importancia de aplicar el eSET (del inglés *Elective Single Embryo Transfer*) en los centros de reproducción asistida (Fechner *et al.*, 2015; López-Regalado *et al.*, 2014; Wilkinson *et al.*, 2015). Cada vez más clínicas apuestan por la transferencia de un solo embrión. Por este motivo debemos conocer los condicionantes del desarrollo embrionario, optimizar al máximo el cultivo y los criterios de evaluación de los embriones para asegurarnos su mejor selección. Según numerosos estudios la edad de la mujer condiciona la calidad ovocitaria (Tarín *et al.*, 2014; Gioacchini *et al.*, 2014; Keefe *et al.*, 2015), e incluso algunos defienden que la edad de la mujer también condiciona el desarrollo a blastocisto (Keefe *et al.*, 2015). Otros estudios (Waldenström *et al.*, 2009; Kirkegaard *et al.*, 2013)

aseguran que la concentración de oxígeno en la que se cultivan los embriones puede condicionar también el desarrollo embrionario.

En los últimos años la tecnología *time lapse* ha ido adquiriendo importancia en los laboratorios de embriología ya que, según numerosos estudios, los parámetros morfocinéticos deberían considerarse al valorar la calidad de los embriones (Milewski *et al.*, 2015; Kirkegaard *et al.*, 2014; Meseguer *et al.*, 2012; A. Wirka *et al.*, 2014; Kirkegaard *et al.*, 2012).

Abordamos estos temas planteando 3 hipótesis distintas para vertebrar el estudio. La primera propone que la edad materna afecta al número de blastocistos que llegan a día 5 post inyección. La segunda plantea que el cultivo en condiciones de baja concentración de oxígeno mejora la

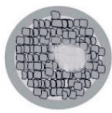
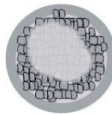
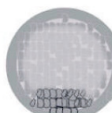
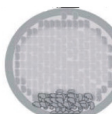

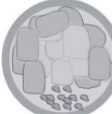
tasa de blastocistos por ciclo tal y como apuntan algunos estudios (Waldenström *et al.*, 2009; Kirkegaard *et al.*, 2013). La tercera hipótesis propone que el tiempo en que un embrión tarda en dividirse a dos células (T2) es un buen indicativo para determinar su potencial de llegada a blastocisto.

Para poder estudiar la validez de nuestras hipótesis hemos realizado un estudio retrospectivo con los datos de 70 ciclos diferentes de nuestro centro de reproducción asistida. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro estudio es un análisis retrospectivo de los datos de un centro privado de reproducción asistida. El estudio se basa en una cohorte de 309 embriones provenientes de 70 ciclos

Figura 1. Valoración morfológica del blastocisto. Adaptación de Baczkowski et al., 2004.

1. Blastocisto primario. Blastocete <50% del tamaño del blastocisto	 1AA		
2. Blastocisto. Blastocete >50% del tamaño del blastocisto.	 2AA		
3. Blastocisto. El blastocete ocupa todo el blastocisto.	 3AA		
4. Blastocisto expandido. El blastocisto es más amplio y la zona pelúcida más fina.	 4AA	 4BB	 4CC
Masa celular interna.	A. Numerosas células, agrupadas y completamente unidas.	B. Bastantes células no unidas.	C. Pocas células y morfología irregulares.
Trofoectodermo	A. Presencia de muchas células regulares organizadas formando un epitelio.	B. Las células no son regulares y no conforman un epitelio bien organizado.	C. Pocas células y morfología irregulares.

diferentes. Todos los ovocitos fueron fecundados mediante ICSI (del inglés *intracytoplasmic sperm injection*) El cultivo de estos embriones se llevó a cabo en medios de Cultivo único (LifeGlobal® Media) hasta día 5 postinyección. La calidad blastocitaria se determinó mediante un sistema que evalúa el grado de expansión del blastocete, la morfología de la masa celular interna y el trofoectodermo (Figura 1, Baczkowski et al., 2004). Nuestro centro está equipado con dos tipos de incubadores: unos con una atmosfera al 5% O₂, 7,5% CO₂ y 87,5% N₂ (sistema de tres gases) y otros al 19% O₂ y 7,5% CO₂ (sistema de dos gases). Los ciclos se distribuyeron de forma aleatoria entre incubadores, 189 embriones fueron cultivados en baja concentración de oxígeno (5%) y 120 en alta concentración de oxígeno (19%).

El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS. La mayoría de nuestras variables seguían

una distribución no normal por lo que se aplicaron tests no paramétricos para su estudio. Las variables con las que trabajamos fueron: edad de la mujer, rango edad de la mujer (<34 años / ≥34 años), porcentaje de blastocistos en día 5, porcentaje blastocistos de alta calidad (AA) en día 5, tipo de incubador según la concentración de O₂.

Para el estudio de correlación entre la edad de la mujer y el porcentaje de obtención de blastocistos (total y AA) se utilizó el test Spearman. Para el estudio de variables independientes se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Además se utilizaron gráficos de cajas para simplificar la visualización de los datos.

Todos los ciclos que se cultivaron en un incubador con alto porcentaje de O₂ tenían un sistema *time lapse* incorporado (PrimoVision™, Vitrolife) y pudimos hacer su seguimiento diario. Los embriones cultivados en un

incubador con bajo porcentaje de O₂ no tenían un sistema *time lapse* acoplado y sólo se valoró su desarrollo en día 1, día 3 y día 5 post inyección.

Aprovechando los datos del sistema *time lapse* se realizó un análisis estadístico para comprobar si el tiempo que tarda un embrión en dividirse a dos células (T2) es indicativo de su potencial de llegada a blastocisto. Para este estudio también se utilizó el test estadístico U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Nuestro estudio se basa en el análisis estadístico de los datos de nuestra clínica. Según el estudio de correlación entre las variables edad y porcentaje de blastocistos podemos ver que se intuye cierta correlación (p=0,067) sin ser estadísticamente significativa. Podemos observar también que cierta correlación se intuye (p=0,181) cuando analizamos la correlación entre edad materna y

Correlaciones

			Edad	PERCENTblastos	PERCENTblastosAA
Rho de Spearman	Edad	Coefficiente de correlación	1,000	-,220	-,162
		Sig. (bilateral)	.	,067	,181
		N	70	70	70

Tabla I. Estudio de correlación edad materna y % blastocistos y edad materna y % blastocistos AA.

porcentaje de blastocistos de buena calidad, sin llegar a ser estadísticamente significativa (Tabla I).

Observamos cómo se distribuyen los datos de porcentaje de blastocistos (totales y de buena calidad) en función del rango de edad (Figura 2). Entre los diferentes grupos de edad no observamos muchas diferencias en cuanto al porcentaje de blastocistos totales obtenidos. Cuando nos fijamos en el gráfico que ilustra el porcentaje de blastocistos de buena calidad en función del grupo de edad vemos que el 50% de las mujeres mayores de 34 años no consiguen blastocistos de buena calidad en sus ciclos.

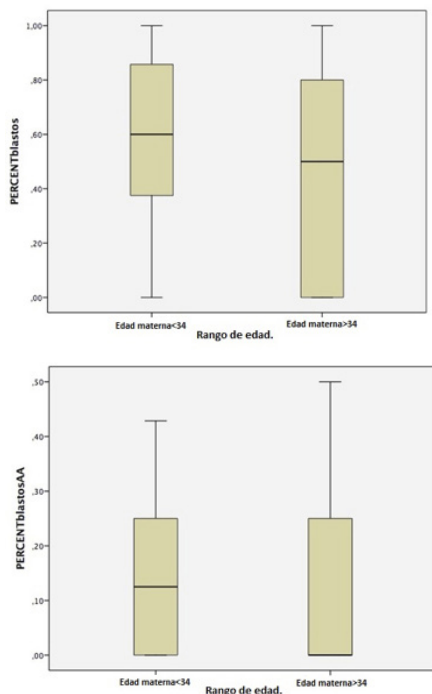


Figura 2. Gráfico de cajas % blastocistos en función del rango de edad de la mujer. A) % blastocistos totales B) % blastocistos de buena calidad (AA).

Sin embargo cuando hacemos el estudio estadístico para determinar si las

diferencias que observamos en los gráficos de cajas poseen un valor estadístico, vemos que no existen diferencias significativas entre pertenecer a un grupo de edad y el porcentaje de blastocistos (Tabla II). De la misma forma, cuando comparamos si el hecho de ser menor o mayor de 34 años influye en el porcentaje de blastocistos de buena calidad vemos que tampoco existe una relación estadísticamente significativa (tabla III).

Estadísticos de contraste^a

	PERCENTblastos
U de Mann-Whitney	437,000
W de Wilcoxon	1662,000
Z	-1,002
Sig. asintót. (bilateral)	,316

 Tabla II. Análisis de la relación edad materna y % blastocistos totales. ^a Variable de agrupación: Rango de edad.

Estadísticos de contraste^a

	PERCENTblastosAA
U de Mann-Whitney	451,000
W de Wilcoxon	1676,000
Z	-,912
Sig. asintót. (bilateral)	,362

 Tabla III. Análisis estadístico relación edad materna y % blastocistos AA. ^a Variable de agrupación: Rango de edad.

Después de estudiar si la edad materna condiciona la llegada a blastocisto, hemos analizado nuestros datos para determinar si el tipo de incubador según la concentración de oxígeno afecta al porcentaje de embriones que llegan a blastocisto y el porcentaje de estos que son de buena calidad. El resultado del test estadístico nos informa que las diferencias entre incubadores no son estadísticamente significativas (Tabla IV).

Otro objetivo del estudio era analizar si el tiempo en que tardan los embriones en dividirse a dos células (T2) es un buen indicativo de su potencial para llegar a blastocisto. Con el análisis estadístico vemos que existen diferencias significativas entre las variables tiempo en llegar a T2 y potencial para desarrollarse a blastocisto (Tabla V). Además, observando la distribución de los datos mediante un gráfico de cajas (Figura 3), vemos que los embriones que tardan más de 35h en hacer la primera división mitótica no se desarrollan a blastocisto.

Estadísticos de contraste^a

	PERCENTblastos	PERCENTblastosAA
U de Mann-Whitney	461,500	447,500
W de Wilcoxon	867,500	853,500
Z	-1,083	-1,387
Sig. asintót. (bilateral)	,279	,165

 Tabla IV. Análisis estadístico % blastocistos totales y % blastocistos AA en función del incubador. ^a Variable de agrupación: Incubador.

Estadísticos de contraste^a

	T2 (h)
U de Mann-Whitney	710,500
W de Wilcoxon	2141,500
Z	-3,568
Sig. asintót. (bilateral)	,000

 Tabla V. Análisis estadístico de las variables tiempo en que el embrión tarda en hacer T2 y llegada o no a blastocisto. ^a Variable de agrupación: Desarrollo a blastocisto?

DISCUSIÓN

Es bien conocido que la edad materna es un factor determinante para la fertilidad de la mujer. Con el presente estudio, a fin de comprobar si existía una correlación entre la edad de la mujer y el porcentaje de blastocistos obtenidos (totales y de buena calidad, AA), se realizó el test de Spearman. Como se ha mencionado en el apartado de resultados, entre ambas variables se intuye cierta correlación pero no es estadísticamente significativa (Tabla I, $p=0,067$ y $p=0,181$). Tampoco existen diferencias significativas cuando los datos son agrupados en rangos de edad (Tabla II y III, $p=0,316$ y $p=0,362$). Con estos resultados no podemos

afirmar ni desmentir nuestra hipótesis que sostiene que la edad materna condiciona el porcentaje de blastocistos obtenidos por ciclo. Debemos tomar estos resultados como parte de un estudio preliminar y aumentar los casos para incrementar su valor estadístico. No hemos encontrado referencias bibliográficas que estudiaran dicha hipótesis para poder contrastar opiniones. No obstante, al observar la distribución de los datos gráficamente (Figura 2) vemos que existen diferencias entre los rangos de edad por lo que sospechamos que es importante seguir con esta línea de estudio.

Existen estudios que demuestran que el cultivo embrionario en baja concentración de oxígeno mejora las tasas de llegada a blastocisto (Waldenström *et al.*, 2009; Kirkegaard *et al.*, 2013). Según los resultados de nuestro estudio, aunque podrían intuirse ciertas diferencias entre el cultivo en alta concentración y baja concentración de oxígeno, el porcentaje de blastocistos obtenidos en ambos casos no es estadísticamente significativo (Tabla IV). No obstante, también pensamos que deberíamos seguir la investigación para añadir más casos e incrementar su peso estadístico. De esta manera podríamos discutir nuestros resultados y compararlos con los demás estudios ya publicados de forma más rigurosa.

Para concluir nuestro estudio aprovechamos la tecnología *time lapse* con la que están dotados nuestros incubadores para contribuir al debate que existe sobre la relevancia de la cinética embrionaria en la selección del embrión. Como postulan numerosos estudios (Milewski *et al.*, 2015; Kirkegaard *et al.*, 2014; Meseguer *et al.*, 2012; A. Wirka *et al.*, 2014; Kirkegaard *et al.*, 2012) la cinética embrionaria es un buen indicador para predecir el potencial de llegada a blastocisto y de implantación en el útero. En la literatura existe cierta controversia sobre si el patrón cinético que siguen los embriones en etapas tempranas del desarrollo es, o no, un buen indicativo de blastulación. Mientras que Campbell *et al.* 2013 opina que no es un buen indicador, Milewski *et al.*, 2015; Basile *et al.*, 2013 demuestran lo contrario.

El presente estudio se centra en el tiempo que tarda el embrión en dividirse a dos células. Según los resultados existen diferencias significativas entre el grupo de embriones que llegan a blastocisto y los que no (Tabla V). Con estos resultados podemos sospechar que la cinética en etapas tempranas del desarrollo es un parámetro que no debe menospreciarse.

Analizando los resultados gráficos obtenidos en los que se relacionan el tiempo que tarda un embrión en dividirse a dos células y la llegada o no a blastocisto (Figura 3), vemos que todos los embriones que se desarrollan a blastocisto hacen T2 antes de las 35h post inyección. Para complementar el estudio podríamos seguir analizando distintos parámetros morfocinéticos para crear un modelo predictivo que nos permitiera valorar el potencial blastocitario en etapas tempranas del desarrollo como han logrado otros grupos (Milewski *et al.*, 2015; Basile *et al.*, 2013; Meseguer *et al.*, 2012). Este modelo sería otra herramienta para nuestro centro y una orientación para todos los que estén equipados con la misma tecnología *time lapse*.

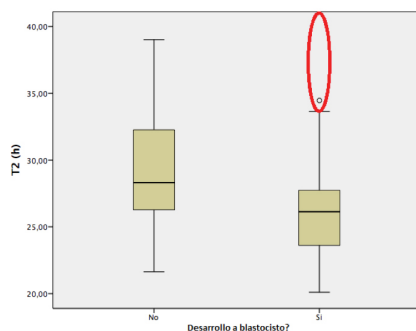


Figura 3. Tiempo que tardan los embriones en hacer la primera división mitótica (T2) en función de si llegan o no a blastocisto. De los embriones que se desarrollan a blastocisto ninguno supera las 35h en hacer T2.

La importancia de la tecnología *time lapse* queda reflejada en algunos estudios (Basile *et al.*, 2013; Campbell *et al.* 2013) donde se demuestra que los embriones cromosómicamente normales y anormales siguen un patrón cinético distinto. De acuerdo con el estudio de Basile *et al.*, 2013 la selección mediante la tecnología *time lapse* no debe considerarse una técnica para reemplazar

el PGS sino que debe considerarse como una herramienta para valorar el buen pronóstico del embrión en pacientes de buen pronóstico en los que no está indicado el uso de PGS.

Para concluir debemos recordar que el desarrollo embrionario es un proceso dinámico que puede verse afectado por infinidad de factores intrínsecos y extrínsecos. El presente estudio nos proporciona una idea sobre los pasos que debemos seguir y hacia donde debemos enfocar nuestra investigación. Debemos considerar el estudio como preliminar e ir añadiendo casos para aumentar el valor estadístico de nuestros resultados y disminuir los errores derivados del azar. De esta manera podremos llegar a unas conclusiones bien fundamentadas y relevantes.

AGRADECIMIENTOS

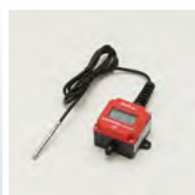
Al equipo del Centro de Infertilidad Masculina de Barcelona (Cimab) por su entusiasmo y gran ayuda en la realización de nuestro estudio. También al Dr. Joan Carrera, director médico de UEG, por brindarme la posibilidad de realizar este estudio con los datos del laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Athayde Wirka K, Chen A a., Conaghan J, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: High prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril.* 2014;101(6):1637-1648.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.02.050.
- Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol.* 2004;4(1):5-22.
- Basile N, Nogales MDC, Bronet F, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril.* 2014;101(3):699-704.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.12.005.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online.* 2013;27(2):140-146. doi:10.1016/j.rbmo.2013.04.013.

- Fechner AJ, Brown KR, Onwubalili N, et al. Effect of single embryo transfer on the risk of preterm birth associated with in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2014;32(2):221-224. doi:10.1007/s10815-014-0381-2.
- Gioacchini G, Giorgini E, Vaccari L, et al. A new approach to evaluate aging effects on human oocytes: Fourier transform infrared imaging spectroscopy study. *Fertil Steril.* 2014;101(1):120-127. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.09.012.
- Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertil Steril.* 2015;103(2):317-322. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.12.115.
- Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril.* 2015;103(2):323-332. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.003.
- Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril.* 2013;99(3):738-744.e4. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.028.
- Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1277-1285. doi:10.1093/humrep/des079.
- López-Regalado ML, Clavero A, Gonzalvo MC, et al. Randomised clinical trial comparing elective single-embryo transfer followed by single-embryo cryotransfer versus double embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;178:192-198. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.04.009.
- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012;98(6):1481-1489. e10. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.08.016.
- Milewski R, Kuć P, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczyński W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2015. doi:10.1007/s10815-015-0440-3.
- Tarín JJ, García-Pérez M a., Cano A. Assisted reproductive technology results: Why are live-birth percentages so low? *Mol Reprod Dev.* 2014;81(7):568-583. doi:10.1002/mrd.22340.
- Waldenström U, Engström A-B, Hellberg D, Nilsson S. Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2009;91(6):2461-5. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.03.051.
- Wilkinson D, Schaefer GO, Tremellen K, Savulescu J. Double trouble: Should double embryo transfer be banned? *Theor Med Bioeth.* 2015;36(2):121-139. doi:10.1007/s11017-015-9324-x.

Microscopio invertido IX73,
flexible, ergonómico
y fácil de usar.



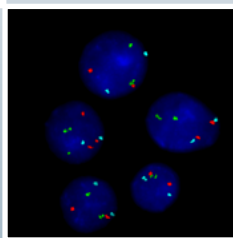
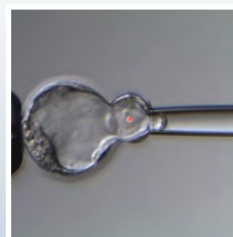
Alarma



Time-lapse



Biopsia TFE



IMSI

FISH

Polarización

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

LA TECNOLOGÍA DEL TIME-LAPSE Y SU APLICACIÓN EN LAS CLÍNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

Marcos Meseguer y Yamileth Motato
 Marcos.Meseguer@ivi.es

Aunque la evaluación embrionaria convencional basada en las observaciones microscópicas estándar sirve como indicador general de la calidad en la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida y ha contribuido de manera significativa al éxito de la fecundación in vitro (FIV), estas tasas de éxito continúan siendo relativamente bajas, con tasas de embarazo clínico de ~ 30% por transferencia según ha informado el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (<http://apps.nccd.cdc.gov/art/Apps/FertilityClinicReport.aspx>) y los registros europeos de la ESHRE (1,2) e incluye la utilización de diferentes sistemas de clasificación embrionaria por parte de los distintos centros, lo que dificulta la definición de las características con las que debe contar el embrión de mejor calidad u óptimo. Por esta razón, en algunos países se ha intentado estandarizar y validar conceptos relacionados con la morfología y calidad embrionaria a través de la creación de consensos nacionales como la Asociación de Embriólogos clínicos (ACE) y la Sociedad Británica de Fertilidad (BFS) en el Reino Unido así como la Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR).

Además de esto, y como consecuencia de la necesidad de reducir el número de nacimientos múltiples, se requieren estrategias que adicionalmente permitan identificar aquellos embriones con el más alto potencial de implantación, lo que constituye un gran desafío, especialmente teniendo en cuenta que la reducción del número de embriones transferidos podría poner en peligro las tasas globales de éxito de los programas de FIV. Por tanto, se han propuesto nuevas metodologías entre las que se encuentran cultivar los embriones hasta la etapa de blastocisto para mejorar la selección con base en su morfología; la realización de la hibridación genómica (Array-CGH) para mejorar la selección con base en su contenido cromosómico y,

más recientemente, estudiar la cinética del embrión a través de la tecnología de time lapse para mejorar la selección basada en marcadores cinéticos (Figura 1).

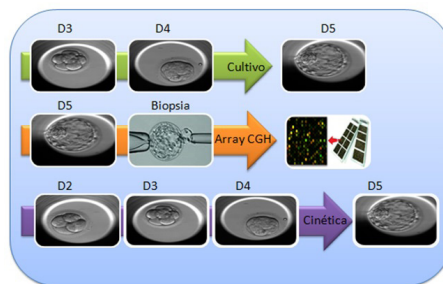


Figura 1. Metodología de la selección embrionaria

En esta revisión vamos a comparar la evaluación embrionaria con sistemas de monitoreo de time lapse (SMT) vs. Evaluación microscópica estándar; vamos a tratar los diferentes equipos disponibles para uso clínico, las limitaciones de esta metodología y vamos a revisar los más recientes artículos publicados basados en esta tecnología.

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA ESTÁNDAR Y SISTEMAS DE MONITOREO DE TIME LAPSE

El desarrollo del embrión humano comienza con la fusión del espermatozoide, transcripcionalmente inerte, y el óvulo (ambos gametos haploides) mediante el proceso de la fecundación en el cual, es posible observar primero la extrusión del segundo corpúsculo polar aproximadamente entre 3-7 horas post-ICSI (3) y segundo, la presencia de dos pronúcleos (PN) momento a partir del cual recibe el nombre de cigoto. Posteriormente, tiene lugar la activación del genoma y el embrión, generalmente, se compacta y forma la mórula seguida de la diferenciación celular en la etapa de blastocisto hacia el día 5 de desarrollo. Así y debido a la rapidez con la que se producen esta serie de cambios en la morfología celular durante el desarrollo preimplantacional, la evaluación microscópica puntual o estándar de los embriones, supone la pérdida completa

de algunos procesos efímeros que se harían evidentes si se visualizase el desarrollo de los mismos de manera continuada.

Además, como ya ha sido expuesto por algunos autores (2), la evaluación morfológica embrionaria es una técnica que por una parte, no siempre resulta exacta ya que embriones considerados de baja calidad con frecuencia han demostrado tener alto potencial para desarrollarse a término y por otra parte, es dinámica y por tanto, puede variar durante los diferentes estadios del desarrollo en períodos cortos de tiempo afectando la evaluación embrionaria así como la decisión del número de embriones a transferir (4) (Figura 2).

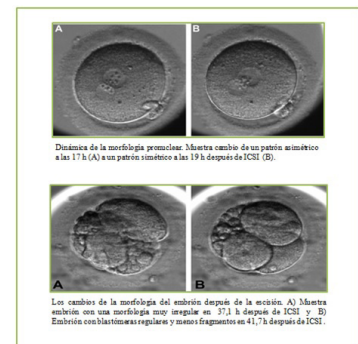


Figura 2. Diferencia clasificación para el mismo embrión en momentos diferentes de su desarrollo

Así, gracias a la tecnología del time lapse, los embriones pueden ser monitoreados de forma continua sin retirarlos del incubador. Aunque se ha utilizado durante décadas, especialmente en el área de investigación (5,6), fue sólo hasta el año de 1997 cuando Payne y colaboradores (7) describieron por primera vez los eventos tempranos del desarrollo embrionario humano y luego, en el año 2008, Mio y Mead describieron la cinética de los acontecimientos hasta el estadio de blastocisto (8) utilizando un Microscopio invertido (IX-71; Olympus, Japan) y microinyector rodeado de una cámara de resina acrílica. A partir de aquí, han sido diversas las observaciones realizadas

por diferentes grupos orientados principalmente, hacia la búsqueda de nuevos marcadores de selección de embriones y surgiendo así, una nueva corriente de clasificación embrionaria basada en la observación del ritmo y cómo se realiza la división de estas blastómeras dentro del embrión que en unión con la evaluación morfológica recibe el nombre de morfocinética. La clasificación morfocinética por tanto, se basa en la medición del tiempo que tardan en producirse diversos procesos fundamentales del desarrollo embrionario, como puede ser por ejemplo: el tiempo que tarda en desaparecer los pronúcleos (PN), cuantas horas transcurren hasta que se genera la primera división o que características presenta esta división, el momento exacto del inicio de la compactación o el momento de la aparición de la cavidad del blastocelo, entre otros. Es así como el cultivo de los embriones en los sistemas de time lapse, han facilitado que los embriólogos/as conozcan más acerca de los posibles errores en la clasificación embrionaria convencional y nos permite seleccionar objetivamente el/los embriones a transferir con base en algoritmos que en los últimos años han sido aplicados y confirman la seguridad de su uso en la clínica diaria. Además y gracias a su incorporación en la rutina diaria del laboratorio, han sido varios los marcadores que se han identificado asociados con la probabilidad mínima de implantación, así como marcadores predictivos de la formación de blastocisto, el potencial de implantación y la normalidad cromosómica.

Por tanto y a diferencia de lo que ocurre con la microscopía estándar (realizado sólo una vez al día) esta herramienta, ofrece un seguimiento continuo del conjunto de cambios morfológicos que ocurren en el tiempo con una evaluación detallada de los eventos que forman parte del desarrollo embrionario preimplantatorio sin someter los embriones a cambios de temperatura ni de pH así como a exposiciones prolongadas de luz, que pueden ejercer un efecto adverso en su desarrollo y calidad. Por otra parte, nos permite detectar eventos anormales que normalmente ocurren entre las observaciones como: divisiones irregulares, formación y reabsorción de

fragmentos, aparición / desaparición de multinucleación, etc.

EQUIPOS DISPONIBLES PARA USO CLÍNICO

Recientemente y gracias a los avances en bioinformática, los sistemas de time



Figura 3. Sistema de Time Lapse con aplicación clínica

Lapse han evolucionado hacia equipos de aplicación clínica de alta tecnología (9-13) (figura 3).

Siendo el Primo Vision (<http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/>) y el EmbryoScope (<http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/>) (Vitrolife) dos de los sistemas más utilizados que emplean la tecnología de campo claro, mientras que el sistema Eeva (Early Embryonic Viability Assessment, Auxogyn) utiliza la tecnología de campo oscuro (<http://www.eevaivf.com/>). Estos sistemas se componen principalmente de cuatro partes: un microscopio, una cámara

digital que graba imágenes en tiempo real, un software de ordenador para el control de la cámara y una incubadora como un entorno para la preservación de las condiciones naturales desde el momento posterior a la microinyección espermática hasta el previo a su transferencia al útero materno (Tabla 1). Las imágenes tomadas a intervalos preestablecidos son conectadas en cortometrajes que permiten ser rebobinados para un análisis detallado.

LIMITACIONES DE LA TECNOLOGÍA DE TIME LAPSE.

Aunque es cierto que las evaluaciones mediante esta tecnología suministran objetividad al proceso de selección embrionaria y permiten ampliar el conocimiento gracias a los datos recopilados, es necesario tener en cuenta que en ocasiones, el reconocimiento automático de las diferentes características de los embriones puede resultar confuso si la calidad de la imagen no es la adecuada, si la posición o transparencia del embrión no lo permiten o si el estadio de desarrollo no es claro y quizá su mayor limitación, es la imposibilidad que presentan ante la necesidad de girar el embrión durante su evaluación ya que gracias a su aspecto tridimensional algunas estructuras y/o características requieren de otro plano para su mejor

Características técnicas	Primo Vision	EEVA	EmbryoScope
Óptica	Campo Claro	Campo Oscuro	Campo Claro
Frecuencia en la captura de imagen	Cada 10 minutos	Cada 5 minutos	Cada 10 minutos (Ajustable)
Planos focales	1	1	7
Capacidad de pacientes	1 por cámara	1 por cámara	6 cada uno con 12 embriones= 72 embriones
Capacidad por placa de cultivo	16 embriones	12 embriones	12 embriones
Incubador integrado	No	No	si
Análisis de imagen	Manual	Tiempo Real	Manual

Tabla 1. Características técnicas de los sistemas de time lapse.

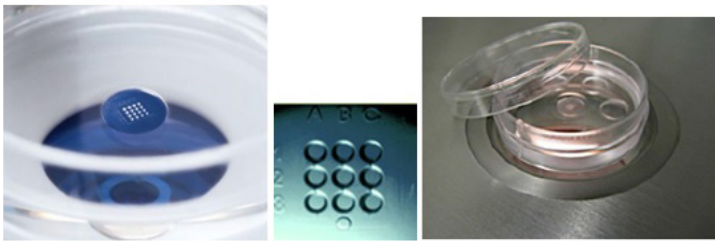


Figura 4. Placa de cultivo embrionario empleada en sistema de Time Lapse Primo Vision (Primo vision embryo culture dish) y EEVA.

visualización. Otra inquietud que se ha suscitado surge ante la posibilidad de desplazamientos de los embriones al momento de posicionar las placas de cultivo dentro del campo de visión del microscopio ya que algunos sistemas de time lapse emplean placas de cultivo en las que los embriones quedan muy cerca uno del otro (Primo Vision y Eeva) lo que daría lugar a errores en la correcta identificación de los mismos (Figura 4).

Sin embargo, gracias a su facilidad de aplicación, gran parte de la investigación reciente se centra en explorar su utilidad mediante la búsqueda de marcadores de competencia ovocitaria y embrionaria.

PUBLICACIONES REALIZADAS CON TIME LAPSE

Desde el primer estudio observacional realizado en humanos por Payne y colaboradores a la fecha, han sido varios los estudios publicados utilizando diferentes modelos así como sistemas de time lapse (Tabla 2). Un ejemplo lo constituye un reporte sobre un caso en concreto, realizado por Pribenszky y colaboradores (2010) (14) en el que el uso de los tiempos de división y la existencia o no de fragmentación fueron utilizados para seleccionar sólo un blastocisto a transferir de dos blastocistos pertenecientes a una mujer de 37 años con intentos fallidos de inseminación y

un ciclo de ICSI, logrando así la gestación y el nacimiento de un nacido vivo. Aunque se trata de sólo un caso como referencia, los autores concluyeron que es una técnica que puede ayudar a elegir, de una manera efectiva, entre dos embriones que mediante el método convencional serían clasificados por igual, pudiendo así tomar una decisión más acertada.

Por otra parte y como se menciona previamente, algunos de los grupos de investigación han logrado obtener información valiosa que les ha permitido proponer algoritmos para predecir la viabilidad del embrión. El primero fue realizado por Wong y colaboradores en 2010 (13), en el que mediante el análisis a través de un sistema de time lapse (Olympus iX-70/1 con apertura para iluminación con campo oscuro) de 242 cigotos descongelados, predicen la llegada a blastocisto teniendo en cuenta la duración de la primera citocinesis (14.3 ± 6.0 minutos); el intervalo entre el final de la primera e inicio de la segunda mitosis (11.1 ± 2.2 h) y el tiempo entre la segunda y la tercera mitosis (1.0 ± 1.6 h) (Figura 5) y sugieren que el éxito o fracaso de llegar a este estadio

Estudio	Objetivo	Conclusión	Tamaño muestral	Sistema de time-lapse
Lemmen et al. (2008)	Identificación de marcadores ligados a calidad embrionaria e implantación	Desaparición temprana de PN y el inicio de la 1 ^{ra} escisión después de la fecundación se correlacionaron con mayor número de blastómeros en el día 2 después de la recuperación de oocitos.	102 embriones correctamente fecundados. 29 embriones transferidos	Nikon Diaplot 300 con cámara incorporada
Hlink et al. (2008)	Análisis de la cronología de eventos mitóticos tempranos	Los tiempos de división tienen gran valor predictivo, aumenta con los cc y permite identificar mosaicismos.	180 embriones, 114 blastocistos de buena morfología	Primo Vision
Pribenszky et al. (2010)	Análisis del desarrollo embrionario Preimplantatorio de embriones de ratón.	Eventos valor predictivo del desarrollo: 1 ^{ra} y 2 ^a división y aparición de fragmentación.	345 en TMS 215 en IC	Primo Vision
Hashimoto et al. (2012)	Evaluar el desarrollo cinético de embriones y su capacidad de llegar a blastocisto	Transición a 3-4 células y de 5-8 células son más cortos en embriones que llegan a blastocisto de buena calidad	80 cigotos desvitrificados	Biostation CT (Nikon)
Chávez et al. (2012)	Análisis de la cronología de eventos mitóticos en embriones de 4 células	Tiempo adecuado del cc se observa en todos los embriones euploides en la etapa de cuatro células, mientras que sólo el 30% de los embriones aneuploides exhiben valores de los parámetros en tiempo normal.	75 cigotos, 53 embriones	Microscopio invertido con iluminación LED modificada para campo oscuro
Conaghan et al. (2013)	Predicción de llegada a blastocisto mediante la comparación de 2 métodos: morfología D3 Vs morfología D3+Eeva.	El uso complementario de la morfología más Eeva mejora la selección de embriones.	1825 embriones distribuidos en: Fase de entrenamiento (98), fase de desarrollo (577) y fase de evaluación (1150).	Eeva
VerMilyea et al. (2014)	Establecer la relación entre clasificación alta, media y baja con base en P2 y P3 e implantación.	Los embriones con puntuaciones altas y medianas tuvieron significativamente más altas tasas de implantación que aquellos con puntuaciones bajas	375 embriones	Eeva
Diamond MP et al. (2015)	Determinar si el uso adicional del Eeva a la evaluación morfológica convencional permite una mejor selección por parte de embriólogos con experiencia.	Los resultados del Eeva en conjunto con la morfología, es informativo para ayudar embriólogos a seleccionar embriones con alto potencial de desarrollo.	54 pacientes	Eeva

Tabla 2. Estudios con diversos tipos de Time Lapse para evaluar marcadores cinéticos en embriones humanos y de ratón

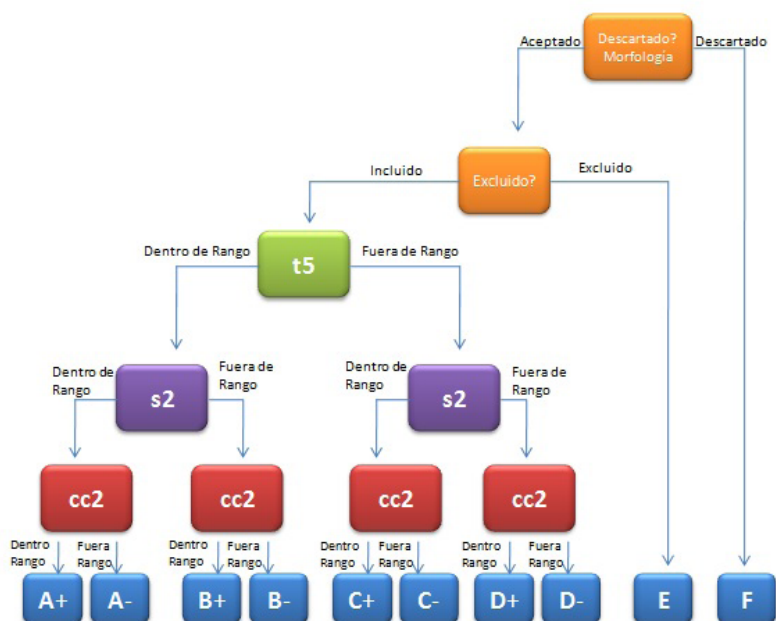


Figura 6. Árbol de clasificación jerárquica embrionaria.

está en parte asociado con su perfil de expresión génica.

Posteriormente y con base en un tamaño muestral más robusto que los publicados hasta la fecha, el grupo de Meseguer y colaboradores en 2011(10) mediante el uso del EmbryoScope, propusieron un algoritmo que genera un árbol de clasificación de 10 categorías (Figura 6) en el que combina los criterios morfológicos convencionales (número de células, simetría y fragmentación) con tres parámetros identificados con gran valor predictivo de implantación que son: el tiempo requerido para alcanzar un embrión de 5 blastómeras o **t5** (48.8-56.6 horas), el tiempo entre la primera y la segunda división mitótica o **cc2** (≤ 11.9 horas) y el tiempo entre la segunda y la tercera división mitótica o **s2** (≤ 0.76 horas), según el análisis de 247 embriones frescos. Adicionalmente, observaron comportamientos embrionarios aberrantes como la multinucleación (MNC) en la etapa de 4 blastómeras, el tamaño desigual de blastómeras en la etapa de 2 células, y la división celular abrupta a tres blastómeras (DC2-3 < 5 horas), que parecen impedir en gran medida la implantación y por lo cual fueron identificados como factores predictivos negativos.

En la tabla que se muestra a continuación se puede observar la correlación entre clasificar el embrión con base en el árbol

creado por Meseguer y colaboradores (10) y el porcentaje de implantación de esos embriones (Tabla 3).

A continuación otros autores tomaron como punto de partida los tiempos de los eventos tempranos embrionarios (t2 a t8) encontrando una asociación con la capacidad de llegar al estadio de blastocisto (15) así como buena morfología (16) en un grupo de embriones de 459 cigotos y 834 embriones respectivamente. Otro análisis que vale la pena mencionar es el realizado por Rubio y colaboradores (17) que confirma, mediante un estudio multicéntrico, que la división Directa (DC2-3 < 5 horas) es un marcador negativo de la implantación como previamente se había sugerido, al informar que sólo aproximadamente el 1% de los embriones que la presentan lo logran.

Recientemente, el estudio de la morfofocinética también ha permitido identificar diferencias en el comportamiento embrionario con base en su contenido cromosómico como lo demuestra Campbell y colaboradores (18) mediante el estudio retrospectivo de 98 blastocistos biopsiados y analizados mediante hibridización genómica comparada por array (CGH array) en los que se observa un retraso en el inicio de la compactación (85.1h); inicio de la blastulación (103.4 para única y para múltiples alteraciones 101.9h) y llegada a blastocisto (110.9 horas) en embriones aneuploides comparados con embriones euploides (79.7h, 95.1h y 105.9 h respectivamente), clasificándolos según su riesgo de probabilidad en bajo, medio y alto, 0.37, 0.69 y 0.97 respectivamente. Posteriormente, Basile y colaboradores (19) utilizando como sistema de time lapse el EmbryoScope, en 717 cigotos de los cuales 504 fueron analizados mediante CGH array, pudieron establecer, mediante regresión logística, que las variables más relevantes asociadas con normalidad cromosómica son t5-t2 y cc3 a partir de las cuales propusieron un árbol de clasificación 4 cuatro categorías o grados (A, B, C y D) con 35.9%, 26.4%, 12.10% y 9.8% respectivamente de euploidia (Figura 7).

También, algunos autores han analizado los posibles efectos de factores tanto intrínsecos como extrínsecos en el comportamiento morfofocinético del embrión entre las que se encuentran: el tipo de medio de cultivo utilizado para el cultivo embrionario (20,21); el tipo y la dosis de gonadotropinas utilizadas para estimularlas pacientes (22); el efecto del

Categoría embrionaria	n total	n implantados	Implantación (%)	Categoría embrionaria	Implantación (%)
A+	29	19	66	A	52
A-	25	9	36	B	27
B+	24	7	29	C	19
B-	25	6	24	D	14
C+	32	8	25	E	8
C-	21	2	10		
D+	10	1	10		
D-	33	5	15		
E	48	4	8		

Tabla 3. Implantación en las categorías embrionarias con base en el modelo de clasificación jerárquica.

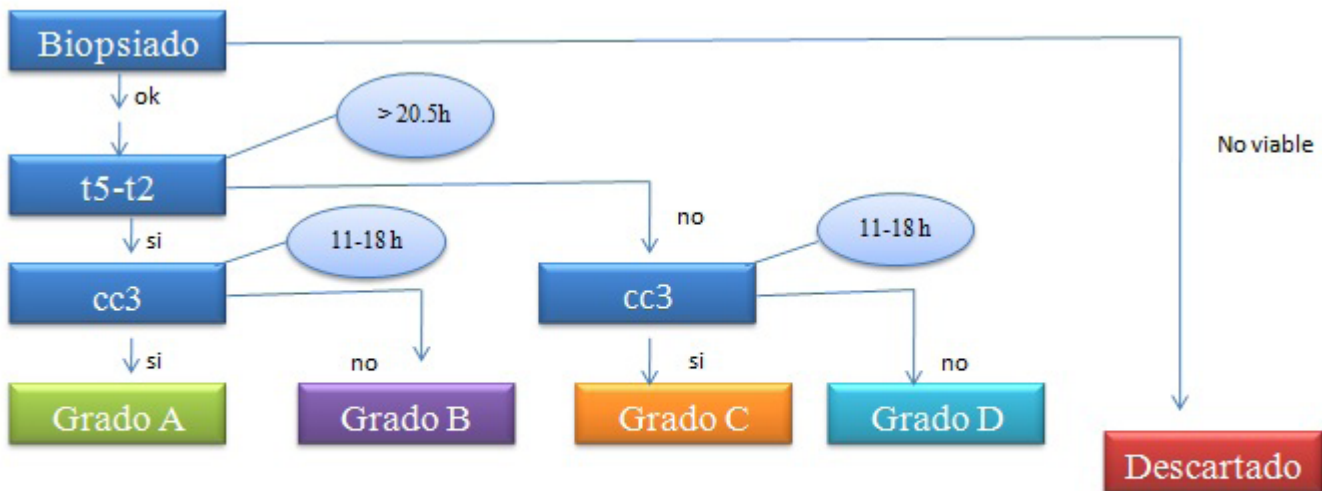


Figura 7. Clasificación jerárquica de embriones con base en la duración del intervalo t5-t2, y del tercer ciclo celular(CC3). El algoritmo clasifica los embriones en cuatro categorías en función del porcentaje esperado de embriones cromosómicamente normales.

índice de masa corporal de las pacientes sometidas a estimulación (23); el efecto de la carga cromosómica (18) y otros incluso han evaluado la seguridad que generan los sistemas de time lapse en el cultivo embrionario (Tabla 4).

En resumen, podemos decir que han sido grandes los avances que se han logrado a partir de la introducción de los sistemas de time lapse para el monitoreo embrionario humano, constituyendo una nueva tecnología que ha conducido al descubrimiento de nuevos datos acerca del desarrollo preimplantatorio y de aplicación en la rutina diaria del laboratorio. Está claro que actualmente se puede predecir la formación de blastocisto en etapas muy tempranas del desarrollo como es el día 2 (13), es posible seleccionar los embriones en base a nuevos algoritmos(10,13) y hemos aprendido que el patrón morfológico

de los embriones puede cambiar en un tiempo muy corto de tiempo (4). Además, que la evaluación morfológica convencional sigue siendo el estándar de oro para iniciar la evaluación de embriones pero que en combinación con el uso de la morfocinética permite al embriólogo/a realizar una selección embrionaria más precisa y objetiva y, por tanto, reducir el número de embriones transferidos y mantener o incluso mejorar los resultados clínicos (24). Al mismo tiempo, la tecnología del time lapse brinda el potencial de mejorar la eficacia de los ciclos de FIV así como reducir costes y aumentar la capacidad de identificar embriones con mayor viabilidad y potencial de implantación.

Finalmente, los avances en esta área de la investigación pueden llegar a ser determinantes a la hora de implementar la transferencia de un único embrión,

como estrategia, ya que ofrece al embriólogo/a una recopilación de datos para la toma de decisiones fundamentada no sólo en el estado actual del embrión sino en su dinámica durante su desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE dagger. Hum Reprod 2014 Oct 10;29(10):2099-2113.

Ajduk A, Zernicka-Goetz M. Advances in embryo selection methods. F1000 Biol Rep 2012;4:11-11. Epub 2012 Jun 1.

Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. Hum Reprod 2012 Sep;27(9):2649-2657.

Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? Placenta 2011 Sep;32 Suppl 3:S252-6.

Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. J Embryol Exp Morphol 1967 Jun;17(3):481-490.

Massip A, Mulnard J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. J Reprod Fertil 1980 Mar;58(2):475-478.

Estudio	Objetivo	Tamaño muestral	Sistema de time-lapse
Nakahara et al. (2010)	Evaluar la seguridad del time-lapse utilizando un incubador con microscopio incorporado	84 ovocitos TMS, 84 incubador convencional (IC)	SANYO In vitro Live Cell Imaging Incubation System (MCOK-5; Sanyo Co., Ltd., Japón)
Cruz et al. (2011)	Demostrar que las condiciones de time-lapse son comparables a las de un incubador convencional	Embriones viables: 68TMS; 84 IC	EmbryoScope™ (Unisense Fertilitech, Denmark)
Kirkegaard et al. (2012)	Comparación del incubador convencional y un incubador con time-lapse	297 ovocitos TMs303 ovocitos IC	EmbryoScope™ (Unisense Fertilitech, Denmark)
Meseguer et al. (2012)	Comparar tasas de gestación en incubador convencional frente a time-lapse	Embriones transferidos: 1390 TMS; 5915 IC	EmbryoScope™ (Unisense Fertilitech, Denmark)

Tabla 4. Estudios relacionados con la seguridad de los sistemas de time lapse.

- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997 Mar;12(3):532-541.
- Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Dec;199(6):660.e1-660.e5.
- Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012 May;27(5):1277-1285.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011 Oct;26(10):2658-2671.
- Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011 Jul;28(7):569-573.
- Pribenszky C, Losonczy E, Molnar M, Lang Z, Matyas S, Rajczy K, et al. Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 2010 Mar;20(3):371-379.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010 Oct;28(10):1115-1121.
- Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, Losonczy E, Zadori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010 Oct;21(4):533-536.
- Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012 Nov;25(5):474-480.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012 Oct;25(4):371-381.
- Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012 Dec;98(6):1458-1463.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013 May;26(5):477-485.
- Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril* 2014 Mar;101(3):699-704.
- Basile N, Morbeck D, Garcia-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013 Mar;28(3):634-641.
- Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012 Sep;29(9):891-900.
- Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012 Oct;25(4):382-389.
- Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013 Mar;28(3):794-800.
- Basile N, Caiazzo M, Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015 Feb 19.
- Matthew D VerMilyea a, Lei Tan b, Joshua T Anthony a, Joe Conaghan c, Kristen Ivani d, Marina Gvakharia e, Robert Boostanfar f, Valerie L Baker g, Vaishali Suraj b, Alice A Chen b, Monica Mainigi a, Christos Coutifaris a, Shehua Shen. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multicentre study. *Reproductive BioMedicine Online* (2014) 29, 729-736.
- Diamond MP1, Suraj V, Behnke EJ, Yang X, Angle MJ, Lambe-Steinmiller JC, Watterson R, Athayde Wirka K, Chen AA, Shen S. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Jan;32(1):61-8. doi: 10.1007/s10815-014-0366-1. Epub 2014 Oct 21.
- Lemmen JG1, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008 Sep;17(3):385-91.
- Shu Hashimoto, Ph.D., a Nobuhiro Kato, Ph.D., b Kazuhiro Saeki, Ph.D., b and Yoshiharu Morimoto, M.D., Ph.D. a Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril*. 2012 Feb;97(2):332-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.042. Epub 2012 Jan 2.
- Chavez SL1, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, Behr B, Reijo Pera RA. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun*. 2012;3:1251. doi: 10.1038/ncomms2249.
- Conaghan J1, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharia M, Loewke KE, Shen S Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril*. 2013 Aug;100(2):412-9.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.

GANADORES DE LAS BECAS "AULA JOVEN" ASEBIR 2015

En primer lugar queremos agradecer a todos los jóvenes participantes que habéis mandado artículos para ser publicados en el apartado Aula Joven de la revista ASEBIR por vuestra ilusión y esfuerzo. La elaboración de un manuscrito y su posterior publicación permite dar a conocer el trabajo que realizáis en vuestros centros de trabajo, difundiendo las novedades y compartiendo conocimientos. Por todo ello sentirnos satisfechos, ya que su publicación y reconocimiento supone un mérito personal para cada uno de vosotros. Somos conscientes del trabajo realizado, que permite, edición tras edición, enriquecer la Revista Asebir y os animamos a seguir desarrollando vuestra vertiente más científica.

En este periodo (junio 2014 - junio 2015), se han presentado un total 7 artículos que optaban a dos becas "Aula Joven". **Los dos ganadores han sido, Juan Carlos Almazán, estudiante de postgrado con el artículo "Células uNK en la interfaz materno-fetal y regulación mediante interacciones KIR/HLA-C" y Ana García de la Unidad de Reproducción Humana del Hospital General Universitario de Valencia con el artículo "Metabólica del medio de cultivo embrionario".** Ambos tendrán

una inscripción gratuita al VIII Congreso de Asebir, que tendrá lugar el próximo mes de noviembre en San Sebastián.

Gracias a los siete por vuestra participación. ¡Y os animamos a todos los socios a seguir participando!

Vocalía de Publicaciones.

ARTICULOS QUE OPTABAN A PREMIO EN ESTA CONVOCATORIA

- 1. Evaluación de dos métodos de capacitación espermática (Swim-Up y Gradientes) mediante el estudio de la morfología, madurez y fragmentación del DNA de los espermatozoides en muestras destinadas a IA.**

Burguera Girau, Alba; de la Orden Rodríguez, Marina; Martínez Sanchis, Juan Vicente; Fernández Colom, Pedro José; Rubio Rubio, José María.

- 2. Screening Genético Preimplantacional (PGS) por factor masculino. Análisis mediante dos técnicas: FISH y a-CGH.**

Lluc Coll, Mónica Parriego, Montserrat Boada, Josep M^a Vendrell, Bonaventura Coroleu y Anna Veiga.

- 3. Resultados de ciclos ICSI y calidad embrionaria con espermatozoides extraídos por biopsia testicular.**

Nuria Zopeque; Javier M^a Gutiérrez; Mercedes Calero; Cristina Carrasco; Santiago García; María de los Ángeles Bailén.

- 4. Células uNK en la interfaz materno-fetal y regulación mediante interacciones KIR/HLA-C.**

Juan Carlos Almazán Milla

- 5. Metabólica del medio de cultivo embrionario.**

A. García; C. Olmedo; N. Díaz; I. Cuevas

- 6. ¿Debemos analizar el X frágil en donantes de gametos y embriones?.**

María Fernández Díaz; Sara Atienza de Nava; Begoña Arnott Fernández; Ignacio Arnott Fernández; Abel Gayo Lana

- 7. Análisis de posibles indicadores de tasa de obtención de blastocistos: edad materna, baja concentración de oxígeno y time lapse.**

Olga Hortala; Aida Casanovas

ASEBIR EN EL II PREMIO DE ARTE GINEFIV



Una año más, la presidenta de ASEBIR ha estado invitada a participar como jurado del *II Premio de Arte Ginefiv*, junto con otros representantes de sociedades científicas, asociaciones de pacientes, medios de comunicación y expertos

del mundo del arte y la fotografía. El certamen gira en torno a la importancia de concienciar sobre las dificultades con las que se encuentran muchas parejas cuando desean tener un hijo y cómo la reproducción asistida puede ayudarles.

En total, más de 500 obras se presentaron a esta segunda edición, que ha estado avalada por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), y por la Sociedad Española de Fertilidad (SEF), así como por el colectivo de pacientes, a través de la Asociación Nacional para Problemas de Fertilidad (Asproin), la organización Masola (Madres solas por elección) y uno de los principales blogs del sector, 'Creando una familia'.

Las obras galardonadas con los primeros premios de las distintas categorías fueron la obra sin título de **Maika Díaz**, dentro de la categoría mejor Pintura Artística, y la fotografía "Father and Son" de **Jaime Francos**, como mejor Fotografía Artística. "El árbol de la vida" de **María Regueira** fue elegida como la Mejor Obra, galardón especial concedido por la Asociación Nacional de Críticos de Arte.

Did you know that...?

HUMAGEN has specialized in manufacturing micropipets since 1992

In 2007, HUMAGEN became a subsidiary of ORIGIO

With ORIGIO's micropipets, you benefit from more than 20 years of experience in manufacturing high quality micropipets

La gama de micropipetas ORIGIO cubre todas sus necesidades de micromanipulación – desde pipetas de ICSI y HOLDING hasta BIOPSIA, ASSISTED HATCHING o DRILLING DE LA ZONA PELÚCIDA.

Las micropipetas ORIGIO representan la misma alta calidad y coherencia de siempre, sello distintivo de los productos HUMAGEN. La planta de fabricación sigue estando en Charlottesville, Virginia, EE.UU.

Hoy combinamos nuestros 20 años de experiencia con la automatización y el control de la producción mediante software. Esto permite unos estrictos controles de calidad en cada paso del proceso de fabricación y en cada pipeta que fabricamos.

Además, somos una compañía que innovamos por lo que le animamos a que pruebe AHORA la nueva pipeta Slimline ICSI:

- Mantiene un diámetro estrecho constante y la rigidez necesaria para penetrar fácilmente la zona pelúcida
- Reduce al mínimo los daños en los ovocitos mediante la creación de un pequeño punto de entrada
- La mejor elección para cargar varios espermatozoides para inyecciones rápidas



Nuevo distribuidor

Las micropipetas ORIGIO Humagen a partir del 1 de enero de 2015 son distribuidas por ORIGIO MediCult España S.L.

Vea más información en www.origio.com o contacte con ORIGIO MediCult España S.L en barcelona@origio.com

MICROPIPETS

origio
for life



2015
VIII CONGRESO
SAN SEBASTIAN
ASEBIR

PALACIO DE CONGRESOS KURSAAL
18-20 NOVIEMBRE

VIII CONGRESO ASEBIR

COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. D. Alfonso Alonso Aranegui

Ministro de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
Gobierno de España

Excmo. Dr. D. Jon Darpón Sierra

Consejero de Salud del Gobierno Vasco

Dr. D. Luis Casis Sáenz

Catedrático-Director
Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología.
Universidad del País Vasco/EUH
Leioa, Bizkaia

COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL

PRESIDENTE

Yosu Franco Iriarte

VOCALES

Victoria Aparicio Prieto
Lorena Crisol Ortiz
José Luis de Pablo Franco
Arantxa Guembe Echarri
María José Iñarra Velasco
Zaloa Larrateagui Laiseca
Miren Mandiola Arizmendiarieta
Belén Murillo Guibert
Carmen Ochoa Marieta
Carmen Puyo Gómez
M^a José Torelló Ybañez
Jesús Zulategui Eraso

COMITÉ CIENTÍFICO

PRESIDENTE CONGRESO

Yosu Franco Iriarte

PRESIDENTA ASEBIR

Montserrat Boada Palá

VOCALES

Antonio Alcaide Raya
Inmaculada Campos Ramírez
Cristina Camprubí Sánchez
Enrique Criado Scholz
Jorge Cuadros Fernández
Cristina González Ravina
Mark Grossmann i Camps
M^a Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
M^a Dolores Lozano Arana
Nereida Ortiz Piñate
Esther Velilla García
Xavier Vendrell Montón

SECRETARÍA ASEBIR

Telf.: 91 367 89 94
E-mail: asebir@asebir.com

SECRETARÍA TÉCNICA

Grupo Process (Betaprocess, S.L.)
C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª
Madrid 28037
Telf.:91 377 14 23 - E-mail: info@congresoasebir.es

PROGRAMA CIENTÍFICO

MIÉRCOLES, 18 DE NOVIEMBRE DE 2015

16:00 - 17:00 HRS. **Inauguración VIII Congreso ASEBIR**

17:00 - 18:00 hrs. **SESIÓN 1 – Andrología (1ª Parte)**

Moderadores Presidenta GI de Andrología: Cristina González Ravina, IVI Sevilla, Sevilla y Mª Victoria Aparicio Prieto, Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, Bizkaia

17:00 - 17:30 hrs. **Antioxidantes y Calidad Seminal**

Ponente: Ana Mª Puigvert Martínez, Hospital Quirón Barcelona, Barcelona

17:30 - 18:00 hrs. **Abordaje de la Azoospermia**

Ponente: Miguel Ruiz Jorro, CREA, Valencia

18:00 - 18:10 hrs. **Pausa**

18:10 - 19:00 hrs. **SESIÓN 1 – Andrología (2ª Parte)**

Moderadores: Presidenta GI de Andrología: Cristina González Ravina, IVI Sevilla, Sevilla y Mª Carmen Puyo Gomez, Centro Ginecológico El Cano, Bilbao

18:10 - 19:00 hrs. **Comunicaciones Andrología**

19:00 - 20:00 hrs. **Symposium COOK - Quality in Long Culture: Pros and Cons of Culturing the Human Embryos to Blastocyst Stage**

Ponente: Prof. Etienne van der Abeel, Laboratory Director at UZ Gent, Belgium

20:00 hrs. **Cocktail Inaugural**

JUEVES, 19 DE NOVIEMBRE DE 2015

08:30 - 10:30 hrs. **SESIÓN 2 – Embriología (1ª parte)**

Moderadores: Presidenta GI de Embriología: Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta, Sevilla y Miren Mandiola Arizmendiarieta, Clínica Quirón Gipuzkoa, Donostia/San Sebastián

08:30 - 09:00 hrs. **Dimorfismo Ovocitarios**

Ponente: Laura Rienzi, GENERA, Roma, Italia

09:00 - 10:30 hrs. **Comunicaciones Embriología 1**

10:30 - 11:00 hrs. **Coffe break**

11:00 - 13:00 hrs. **SESIÓN 2 – Embriología (2ª parte)**

Moderadores: Presidenta GI de Embriología: Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta, Sevilla y Zaloa Larrateagui, Clínica IVI, Bilbao

11:00 - 11:30 hrs. **Peculiaridades del Cultivo hasta Blastocisto**

Ponente: Aisling Ahlstrom, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Suecia

11:30 - 13:00 hrs. **Comunicaciones Embriología 2**

13:00 - 14:00 hrs. **Simposio Grupo EMB - The ART of oocyte and embryo vitrification: Closing the open issue**

Ponente: Mark Larman, Vitrolife, Göteborg, Sweden

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

15:00 - 16:40 hrs. **SESIÓN 3 - Criobiología**

Moderadores Presidente GI de Criobiología: Mark Grossmann i Camps, BARCELONA IVF, Barcelona y Jesús Félix Zulategui Eraso, Complejo Hospitalario Virgen del Camino, Pamplona

15:00 - 15:30 hrs. **Ventaja y Problemática de Trabajar con un Banco de Óvulos. Transporte de Gametos y Embriones**

Ponente: Enrique Criado Scholz, Ovobank Spain, Marbella, Málaga

15:30 - 16:00 hrs. **Large Volume Vitrification: The Metastable Advantage**

Ponente: James J. Stachecki, Innovative Cryo Enterprises LLC, Linden, New Jersey, USA

16:00 - 16:50 hrs. **Comunicaciones Criobiología**

16:50 - 17:20 hrs. **Exposición premios EMB-ASEBIR 2013**

Moderadores: Presidente del Comité Organizador, Yosu Franco Iriarte y Lorena Crisol Ortiz, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

PROGRAMA CIENTÍFICO

16:50 -17:05 hrs. **Determinación del perfil metabólico del medio de cultivo embrionario como posible marcador no invasivo de calidad embrionaria**

Ponente: Irene Cuevas Saiz, Hospital General Universitario, Valencia

17:05 – 17:20 hrs. **Genotipado del SNP R72P del gen p53 en pacientes con fallo de implantación y aborto de repetición y su efecto en los resultados de los ciclos de FIV**

Ponente: Belén Lledó Bosch, Instituto Bernabeu, Alicante

17:20 - 17:30 hrs. **Pausa**

17:30 - 18:30 hrs. **Simposio Merck**

19:00 hrs. Carrera Solidaria. Carrera de 5 km. por el centro de San Sebastián

21:30 hrs. **Cena y Entrega del Premio ASEBIR al mejor Póster 2015**

VIERNES, 20 DE NOVIEMBRE DE 2015

08:30 - 10:00 hrs. **SESIÓN 4 - Genética**

Moderadores Presidenta GI de Genética: Esther Velilla García, Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona y Aranzazu Guenbe Echarri, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

08:30 - 09:00 hrs. **Epigenética y Reproducción Asistida**

Ponente: Cristina Camprubí Sánchez, GenIntegral, Barcelona

09:00 - 10:00 hrs. **Comunicaciones Genética**

10:00 - 10:30 hrs. **Coffe break**

10:30 - 12:00 hrs. **SESIÓN DEBATE. Screening de Enfermedades Recesivas para Donantes y Pacientes**

Moderadores Presidenta GI de Genética: Esther Velilla García, Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona y María José Iñarra Velasco, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián

Ponentes: Ernesto Boch. Instituto Valenciano de Reproducción, IVI, Valencia

Encarna Guillén Navarro, H. Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia

Pedro José Femenía López. Decano Facultad Derecho, UA, Alicante

12:00 - 14:00 hrs. **Asamblea General Ordinaria ASEBIR**

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

15:00 - 16:00 hrs. **Simposio ORIGIO**

16:00 - 17:40 hrs. **SESIÓN 5 - Calidad**

Moderadores: Presidenta GI de Calidad: Nereyda Ortiz Piñate, Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid y Carmen Ochoa Marieta, Clínica COTERO, Centro CER, Santander

16:00 - 16:30 hrs. **Sistema de Biovigilancia en TRA en España: Efectos y Reacciones Adversas**

Ponente: Maravillas Izquierdo Martínez. Subdirectora General de Cartera Básica de Servicios del SNS y Fondo de Cohesión. Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid

16:30 - 17:00 hrs. **Medición y Validación de Parámetros Esenciales en el LRHA: Temperatura, CO2 y pH**

Ponente: Nicolás Prados Dodd, IVI Sevilla, Sevilla

17:00 - 17:40 hrs. **Comunicaciones Calidad**

17:40 - 17:55 hrs. **Exposición Mejor Póster 2015**

Moderadores: Montserrat Boada Palà, Presidenta de ASEBIR y Yosu Franco Iriarte, Presidente Comité Organizador

17:55 - 18:25 hrs. Ponencia de Clausura

Moderadora: Montserrat Boada Palà, Presidenta de ASEBIR

Ponente: Luca Gianaroli, Direttore Scientifico. SISMeR - Società Italiana Studi di Medicina della Riproduzione. Bologna, Italy

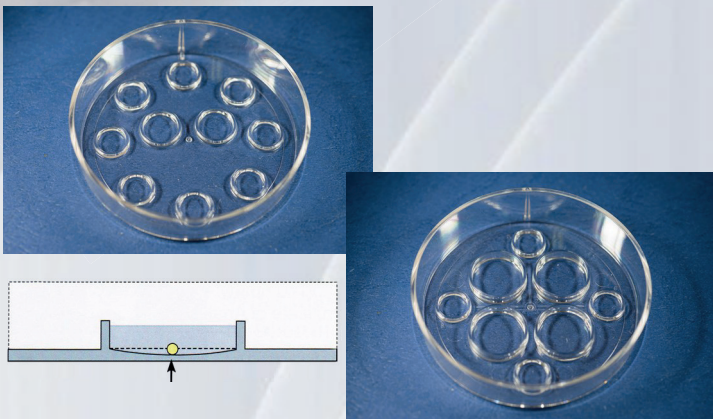
18:25 - 19:45 hrs. **Despedida y Cierre del Congreso a cargo del Presidente del Comité Organizador, Yosu Franco Iriarte y la Presidenta de ASEBIR, Montserrat Boada Palà**

21:00 hrs. **Cena de Gala y Entrega de Premios EMB-ASEBIR 2015**



Global® Medio Único

Ya es posible cultivar el Embrión hasta Blastocistos, sin cambio de medio. Más de 150 Estudios Clínicos publicados, a lo largo de 15 años, avalan los resultados.



Placas de cultivo GPS

- Diseño de pocillos cóncavos para la localización y valoración morfológica más rápida.
- Base totalmente plana para mejorar el intercambio de temperatura.
- Se pueden utilizar en incubadores de sobremesa
- Embryotestadas.
- Marcado CE y FDA



Aceite LifeGuard® Oil

Aceite de alta densidad, que permite proteger eficazmente al embrión, de los cambios de pH y Temperatura.



Medidor de pH epoc®

- Equipo portátil para la medición del pH
- Calibración automática interna
- No requiere buffers de calibración
- Resultados de la medición en 30 segundos
- Batería interna recargable

CURSOS 2015

IV Practicum ASEBIR de Micromanipulación (ICSI y Assisted Hatching)

Fecha: 22-23 de mayo de 2015

Sede: CCMI. Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaría técnica: CCMI

Email: nhernandez@ccmijesususon.com

<http://asebir.com/cursos/1527/>

Curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR

III Practicum ASEBIR de Embriología Clínica: Inseminación, valoración de la fecundación y desarrollo embrionario

Fecha: 25-26 de junio de 2015

Sede: CCMI. Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaría técnica: CCMI

Email: nhernandez@ccmijesususon.com

<http://asebir.com/cursos/iii-practicum-asebir-de-embriologia-clinica-inseminacion-valoracion-de-la-fecundacion-y-desarrollo-embrionario/>

Curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR

III Practicum de Vitricación de ovocitos y embriones

Fecha: 02-03 de Julio de 2015

Sede: CCMI. Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaría técnica: CCMI

Email: ematilla@ccmijesususon.com

<http://asebir.com/cursos/iii-practicum-asebir-de-vitrificacion-2/>

Curso organizado por el Grupo de Interés de Criobiología de ASEBIR

Curso on-line: Actualización de la Catalogación Embrionaria ASEBIR

Fechas: 15-30 de septiembre de 2015

Sede: On line

Secretaría técnica: ASEBIR

Email: asebir@asebir.com

Curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR

I Practicum de selección espermática

Fecha: 17-18 de Septiembre de 2015

Sede: Aula EMB-ASEBIR de Cáceres

Secretaría técnica: CCMI

Email: ctobajas@ccmijesususon.com

Curso organizado por el Grupo de Interés de Andrología de ASEBIR

Seguridad laboral en el laboratorio de reproducción humana (Curso Precongreso N° 1)

Fecha: 18 de Noviembre de 2015

Sede: Palacio de Congresos Kursaal de Donostia-San Sebastián.

VIII Congreso ASEBIR en Donostia-San Sebastián

Secretaría técnica: Grupo Process (Megaprocess S.L.)

Email: inscripciones@congresoasebir.es

<http://congresoasebir.es/programa/programa-cursos-precongreso/>

Organizado por el Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR en el marco del VIII Congreso ASEBIR <http://congresoasebir.es/>

¿Cómo ganarle la partida a un REFEREE? Claves metodológicas: Epidemiología y bioestadística de un estudio de embriología clínica (Curso Precongreso N° 2)

Fecha: 18 de Noviembre de 2015

Sede: Palacio de Congresos Kursaal de Donostia-San Sebastián.

VIII Congreso ASEBIR en Donostia-San Sebastián

Secretaría técnica: Grupo Process (Megaprocess S.L.)

Email: inscripciones@congresoasebir.es

<http://congresoasebir.es/programa/programa-cursos-precongreso/>

Organizado por ASEBIR Formación en el marco del VIII Congreso ASEBIR <http://congresoasebir.es/>

CONGRESOS 2015

ESHRE 2015

Dates: 14 - 17 June 2015 / Portugal, Lisbon

Congress Venue: FIL - Feira Internacional de Lisboa (Rua Bojador, 1990-207 Lisbon, Portugal)

E-mail: info@eshre.eu

<http://eventegg.com/eshre-2015/>

The 22nd World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI)

Dates: Budapest, Hungary - September 17-20, 2015

Congress Venue: Syma Event and Congress Centre (DózsaGyörgy str. 1. - H-1146 Budapest - Hungary)

Email: cogi@congressmed.com

<http://www.congressmed.com/cogi/>

71st Annual Meeting of the ASRM

Dates: October 17-21, 2015

Congress Venue: Baltimore Convention Center, Baltimore, MD, USA

Email: asrm@asrm.org

<http://www.seud.org/news-updates/article/ASRM-2015/>

Congreso ASEBIR 2015

Fecha: 18 de Noviembre de 2015

Sede: Palacio de Congresos Kursaal de Donostia-San Sebastián.

Secretaría técnica: Grupo Process (Megaprocess S.L.)

Email: info@congresoasebir.es

<http://congresoasebir.es/>

OTRA INFORMACIÓN

Examen de certificación ASEBIR

Fecha: 18 de noviembre de 2015

Sede: Palacio de Congresos Kursaal de Donostia-San Sebastián.

VIII Congreso ASEBIR en Donostia-San Sebastián

Hora: de 09:00 a 10:30 hrs.

Dead Line de admisión de solicitudes: 30 de junio de 2015 a las 19:00 hrs.

Más información en: <http://asebir.com/formacion/certificacion-asebir/>

ASEBIR

UNA APUESTA POR LA CALIDAD

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

www.asebir.com

ASEBIR

UNA APUESTA POR LA CALIDAD