

REVISTA

ASEBIR

III CONGRESO ASEBIR



17-18 Noviembre 2005



Actualidad

Es Tiempo de Cambios:
La Directiva Europea sobre Tejidos y Células.

Artículos

Organización y Recursos Físicos en los Laboratorios
de FIV de los Centros de Reproducción Asistida:
Encuesta Nacional.

Nuevos Avances en el Estudio
de la Integridad del DNA Espermático.

Debates

¿Qué esperas de ASEBIR?

Formación Continuada

Cambios de Expresión del Receptor de
Andrógenos con la Subfertilidad del Varón.

Noticias

Agenda

Imágenes para el Recuerdo

Boletín de Inscripción

VITRIFICACIÓN

- * Congelación celular **ULTRARÁPIDA**, sin seeding ni rampa
- * Menor estrés osmótico = menor daño celular
- * Sin necesidad de equipos especiales

EL MISMO KIT PARA OOCITOS, EMBRIONES Y BLASTOS
CRYOTIPS™: SISTEMA CERRADO DE CONSERVACIÓN DE MUESTRAS



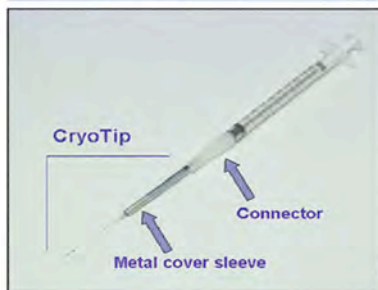
VIT KIT-FREEZE:

VITRIFICACIÓN: 7 (2PN) - 17 min (blastos)



VIT KIT-THAW:

DESVITRIFICACIÓN: 15 min



CRYOTIPS™:

sistema herméticamente cerrado de
conservación de muestras: pajuela termosellada

Publicaciones recientes:

Kuwayama et al. Highly Efficient Vitrification of Human Oocytes. RBM Online 11:300-308, 2005

Stehlik et al. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. RBM Online 11:53-57, 2005

Kuwayama et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. RBM Online 11: 608-614, 2005

ASEBIR

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

SUMARIO	<u>Pág.</u>
EDITORIAL	5
M.Grossmann	
ACTUALIDAD	
Es Tiempo de Cambios: La Directiva Europea sobre tejidos y células	6
A. Veiga y J.A. García Velasco	
ARTÍCULOS	
Organización y recursos físicos en los laboratorios de FIV de los centros de reproducción asistida: Encuesta Nacional	9
C.González-Varea, J. Aguilar, C. Fernández, A. Garrido, M. Sánchez, M.Hernández, S. Calderón, R. Martínez y J. A. Castilla.	
Nuevos Avances en el Estudio de la Integridad del DNA Espermático	14
J. G. Álvarez.	
DEBATES	
Introducción al debate	24
¿Qué esperas de Asebir?	24
I.Solvás y M.C.Pons	
¿Qué esperas de Asebir?	24
F. Marina	
¿Qué esperas de Asebir?	28
A. Urries	
¿Qué esperas de Asebir?	29
M.V. Hurtado de Mendoza, M. Grossmann y N.Cremades.	
IN MEMORIAN	31
J.A. Castilla	
FORMACIÓN CONTINUADA	
Cambios de Expresión del Receptor de Andrógenos con la Subfertilidad del Varón	32
E.D. Galo, P. González-Peramato, R. Gómez-Pérez, M.Nistal y J. Regadera	
NOTICIAS	40
AGENDA	46
INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES	50
BOLETÍN DE INSCRIPCIÓN	51
IMAGEN DE PORTADA: III Congreso Asebir	

Vol. 11 • N° 1 • Junio 2006

EDITA.

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

JUNTA DIRECTIVA.

*Presidente: Antonio L. González-Utor
Vicepresidenta: Carmen Ochoa
Secretaria: Begoña Arán
Tesorero: Manuel Ardoy
Vocales: Nieves Cremades, Mark Grossmann, M^a Victoria Hurtado de Mendoza, Jorge Cuadros, Juan Manuel Moreno, M^a José de los Santos, Fernando Marina y Jorge Ten.*

COORDINACIÓN

DE LA REVISTA.

*Nieves Cremades
Mark Grossmann
M^a Victoria Hurtado de Mendoza*

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES.

ASEBIR

Secretaría ASEBIR:

*c/ Cronos , nº 20, Bloque 4 , Local 6
MADRID 2029
Tel. 91 367 89 94 - Fax 91 377 49 65*

DISEÑO, MAQUETACIÓN e IMPRESIÓN.

RECCO Imagen y Desarrollo, S.L.L.

*c/ Albarracín, 56 - 28037 Madrid
Tel. 91 754 00 26 - Fax 91 754 16 05
E-mail: recco@recco-sll.com*

Depósito Legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

Soporte Válido: 78-R-CM

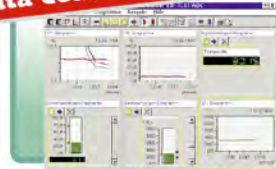
Instrumentación para FECUNDACIÓN IN VITRO

Incubadores de CO₂:

- ✓ Volumen recinto interior: 150 / 240 litros
- ✓ Sistema patentado de esterilización automática por vapor a 90 °C **Contracon**
- ✓ Sistema de alarma del nivel de agua
- ✓ Interface RS232
- ✓ Sistema **Data Control** opcional para control de todos los parámetros de varios equipos simultáneamente

Heracell 150/240

Data Control opcional



Cabinas de flujo laminar para FIV:

- ✓ Cabinas de flujo laminar para técnicas de Fecundación In Vitro, con mesa de acero inoxidable calefactada por agua o mesa de aluminio calefactada eléctricamente
- ✓ Anchos disponibles: 90 / 120 / 150 / 180 cm
- ✓ Gran variedad de accesorios

Sterile SS / Al

Cabina con
preparación para
FECUNDACION
IN VITRO



Centrífugas:

- ✓ Capacidad: 4 x 400 ml / 32 x 15 ml / 20 x 25 ml / 12 x 50 ml
- ✓ Velocidad máxima: 6.000 rpm
- ✓ FCR máx.: 6.842 xg
- ✓ Disponible versión refrigerada

Multifuge 1

Novedad

Centrifuga
Multifuge I



Autoclaves:

- ✓ Modelos de sobremesa
- ✓ Capacidad: 75 / 135 litros
- ✓ Sistema de chaqueta para generación del vapor separada de cámara principal

H+P Compact

Autoclaves H+P



Otros equipos relacionados



Baños



Balanzas
analíticas



Agitadores



Conservadores +4°C
Congeladores -85°C
Cryoconservadores -150°C



Estufas de cultivo /
secado / esterilización



Mobiliario
técnico de
laboratorio

Controltecnica Instrumentación Científica S.L.

C/ Artesanos, 7 (Prado del Espino)
Tel. 91 728 08 10

28660 Boadilla - Madrid

Fax. 91 729 44 54

BARCELONA: 93 486 46 60

ANDALUCÍA: 679 21 02 33

VALENCIA: 679 20 85 37

MURCIA: 686 93 68 31

GALICIA: 616 42 70 94

www.controltecnica.com

SORVALL®
Heracell

CONTROLTECNICA
▲ instruments

Josep Egozcue: in memoriam



El pasado día 7 de Febrero falleció, en Barcelona, Josep Egozcue Cuixart.

Quienes le conocieron “sólo” como moderador en alguna sesión científica o de divulgación seguro que recordaran sus ojos curiosos escudriñando a través de las grandes gafas, o quizás su ironía.

Quienes le conocieron “sólo” como ponente en algún curso de postgrado o seminario seguro que recordaran su racionalismo, su concisión, y su formación humanista antagónica a las súper-especializaciones actuales.

Quienes le conocieron “sólo” como profesor universitario seguro que recordaran sus precisos esquemas de la resolución de los quiasmas dibujados a mano con pedazos diminutos de tiza, y su trato bondadoso.

Y quienes “sólo” le tuvieron de oponente en algún debate seguro que recordaran la demoledora potencia de sus argumentos (tuviese o no razón).

Desde que ocupó la primera cátedra de Biología Celular creada en España (1984), el profesor Egozcue supo gestar un amplio equipo de titulares e investigadores en las áreas de conocimiento de Biología Celular, Citogenética y Genética Humana. Lector incansable y acérrimo promotor de los enfoques multidisciplinarios, impulsó los proyectos que se le propusieron y luego “dejó hacer” sin perderse ni un detalle. Siempre dispuesto para interpretar resultados y argumentar conclusiones, en las más de 170 actuaciones como ponente o moderador en congresos de toda índole, infatigablemente promovió a sus discípulos.

Pero para elogiar su capacidad docente, mucho más que el número de ponencias deberíamos valorar la magnitud y diversidad de las líneas de investigación abiertas en su equipo... y que en todas ellas participaba y corregía trabajos: ¿quién de entre sus pupilos no recordará sus correcciones? Devolvía los manuscritos con sus anotaciones en una letra minúscula escrita en líneas ligeramente ascendentes hacia la esquina derecha y plagadas de flechas que entrelazaban unas ideas con otras y podían llenar hasta el último rincón de una página (que eso ocurriera dependía de la habilidad/inhabilidad de cada autor, claro).

Para los que aprendimos de él y trabajamos con él... su muerte nos deja huérfanos.

Huérfanos de ese genuino trato afable y siempre respetuoso; huérfanos de ese característico espíritu libre-pensador que buscaba incansablemente la sana controversia; huérfanos de ese elegante estilo de rigurosidad y de honestidad propio de los mejores investigadores; huérfanos de esa enorme capacidad de trabajo y animosidad que inspiraba a todos los miembros de su equipo; huérfanos, en fin, de Josep.

Eminente científico y cálida persona, en el 2000 fue nombrado Ceretano del año (desde pequeño mantuvo un fuerte vínculo con las poblaciones de Puigcerdà i Llívia, La Cerdanya), a pesar de que, según cuentan las crónicas, dejó las competiciones de esquí para dedicarse a los hobbies de coleccionar estatuillas de monos y primates e imágenes de Marilyn Monroe. Sus pasiones actuales (que compartía con su esposa Marta) eran el golf y sus nietos.

Todos echaremos en falta su erudición y su carácter.

Trayectoria profesional

Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático emérito de Biología Celular de la Universitat Autònoma de Barcelona, inició su formación como investigador en 1965 en el Regional Primate Research Center de Beaverton (Oregon, USA).

A lo largo de su dilatada carrera el profesor Egozcue fue responsable del laboratorio de citogenética del Institut Vicent Villar i Palasí (UAB) y de la Red Temática sobre Reproducción (Generalitat de Catalunya); fue miembro fundador y vicepresidente de la Asociación de Genética Humana; miembro fundador y presidente de la Sociedad Española de Andrología y de la European Society of Human Reproduction, así como promotor de la Sociedad Española de Diagnóstico Prenatal.

Autor o coautor de más de 500 artículos científicos participó, como miembro editorial, de prestigiosas revistas como Andrología, Int. Journal of Andrology, Folia Primatologica, Journal of Human Evolution, Human Reproduction, Int. Journal of Developmental Biology, Human Evolution, Medicine...

Asesor de numerosas organizaciones como Ministerio de Sanidad, National Institutes of Health, UCLA, Ford Foundation, CIRIT, CAICYT, UNESCO, WHO, SEF, ANEP, CE, The Kyoto prize, EMBO, Col·legi Oficial de Metges de Barcelona, National Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek... recibió la Medalla Narcís Monturiol al mérito científico y tecnológico (1989); el Premio Fundació Catalana per a la Recerca (1996), la Medalla de oro del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Institut Universitari Dexeus (1997) y el premio a la trayectoria humana y profesional de la Asociación de Genética Humana (1999).

En su última etapa profesional dedicó muchos esfuerzos a los temas de bioética. Promotor y miembro del comité científico de la Sociedad Internacional de Bioética; patrono y Vicepresidente de la fundació Víctor Grífols i Lucas y miembro del Observatorio de Bioética y Derecho de la Universitat de Barcelona, trabajó con ahínco para difundir información veraz sobre temas con posible “conflicto” ético (investigación con embriones, selección de género, células madre...) y procuró el debate público incluso mediante premisas deliberadamente provocadoras.

Académico numerario de la Reial Academia de Ciències i Arts de Barcelona (1999) y primer socio honorífico de ASEBIR (2001), también fue designado miembro de honor de ESHRE (2003).

Mark Grossmann i Camps
Junta Directiva ASEBIR

ES TIEMPO DE CAMBIOS: LA DIRECTIVA EUROPEA SOBRE TEJIDOS Y CÉLULAS.

Anna Veiga ^{(1)*} y Juan A. García Velasco ^{(2)*}

¹Institut Universitari Dexeus, Barcelona y ²IVI-Madrid. *Representantes españoles en la European Assisted Conception Consortium (EACC).

Han transcurrido ya 30 años desde el primer embarazo conseguido mediante FIV y obviamente son muchos los cambios a los que hemos asistido. Sin duda, muchos de estos cambios han estado basados bien en el empirismo o bien en la evidencia científica que nos ha ido guiando en la dirección que tomaban estas modificaciones en el método, las condiciones y en definitiva, en la forma de trabajar. Curiosamente, al menos en nuestro país, la legislación siempre ha ido por detrás en lo que a requerimientos y normativas se refiere.

Desde la primera ley de reproducción asistida del año 1988 hasta la última de 2003 y actualmente vigente, se le ha dedicado poco o ningún espacio a los estándares requeridos para la práctica de la reproducción asistida. La normativa vigente claramente establece cómo debe organizarse y los controles mínimos que deben realizarse en un quirófano o en un banco de sangre, y en cambio esto no ocurre para un laboratorio de semen, de fecundación in vitro, de biopsia embrionaria o incluso para un banco de embriones, óvulos o tejido ovárico o testicular. En la actualidad, la SEF está preparando unas recomendaciones o guías en este sentido, que ayuden posteriormente a los legisladores a elaborar las normas de obligado cumplimiento.

A medida que nuestro país se incorpora a la Unión Europea (UE), las directivas que legislan -o al menos aconsejan y ayudan a su implementación- en determinadas áreas como puede ser la nuestra, empiezan a

cobrar una relevancia hasta ahora desconocida. El 31 de marzo del 2004, el Parlamento Europeo publicó una directiva sobre los estándares de calidad y seguridad para la donación, obtención, evaluación, procesamiento, congelación, almacenaje y distribución de tejidos y células de origen humano, y el plazo para su aplicación son dos años desde su publicación, es decir, Abril de 2006 (Directiva 2004/23/EC del Parlamento y el consejo de Europa de 31 de Marzo *setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells*). El objetivo era establecer unos criterios uniformes para todos los países miembros de la UE para la importación/exportación de determinados tejidos (como por ejemplo, válvulas cardíacas), la abierta disponibilidad de tejidos donados, pero también evitar errores procedentes de múltiples y variados sistemas de codificación y clasificación. Esta directiva se aplicaría a todos los tejidos y células humanas (células madre procedentes de sangre periférica, médula ósea o cordón umbilical, células madre adultas y embrionarias, células y tejidos fetales, y células reproductivas), excluyéndose sangre y derivados y órganos humanos. No se aplicaría a tejidos y células usadas como autoinjertos realizados en el mismo acto quirúrgico -sin necesidad de ser almacenadas temporalmente en un banco de tejidos-.

Lo que pretende esta directiva es promover el mayor nivel de protección posible para asegurar la salud pública

en lo que respecta a la calidad y la seguridad de los tejidos y las células, y regularía: a) la acreditación, asignación o autorización de los centros, b) la obtención de tejidos y células, c) un sistema de calidad, incluyendo la formación, d) los criterios para la selección de donantes de tejidos y células, e) las pruebas a realizar a los/las donantes, f) los procedimientos tanto para la obtención como para la recepción de tejidos y células, g) los procedimientos para prepararlos, h) su procesamiento, almacenamiento y distribución, y i) la asignación y distribución a los receptores de estos tejidos y/o células.

Es interesante resaltar que la directiva engloba por igual los criobancos (semen, ovocitos, tejido ovárico), los centros de inseminación artificial y los laboratorios de FIV. Algunos aspectos concretos y específicos del campo de la Reproducción Asistida (RA) no fueron contemplados por la Directiva, por lo que está previsto que se elaboren documentos anexos que lo cubran de manera específica. La Comisión Europea es consciente de la especificidad de nuestro ámbito de trabajo y asume la necesidad de establecer pautas de funcionamiento especiales para ello.

Por otra parte, cabe destacar la creación de un Consorcio *ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology) - HFEA (Human Fertilisation and Embryology Authority, UK), el European Assisted Conception Consortium (EACC)* que pretende facilitar la implantación de la Directiva

en los países miembros así como asesorar a la Comisión Europea en lo referente a la Reproducción Asistida (<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=678>). Brevemente, podríamos decir que el principal objetivo de la EACC es reunir a los legisladores y a los profesionales en Reproducción Asistida de la Unión Europea con el fin de promover cooperación profesional y acciones conjuntas en torno a la Directiva 2003/24. Existe ya apartado EACC en la web de ESHRE donde se puede obtener información.

Objetivos específicos:

* Promover un marco organizativo para desarrollar y presentar posturas conjuntas a la CE en aspectos relacionados con la regulación de la RA.

* Compartir conocimientos durante la implementación de la Directiva y desarrollar soluciones a los problemas que se presenten

* Ayudar a mejorar la consistencia y compartir métodos de buenas prácticas para promover la seguridad y la calidad a través de la comunicación entre estados miembros.

* Concienciar de la necesidad de mejoras continuadas en la asunción de los requerimientos de la Directiva y cooperar en el desarrollo de evidencias que apoyen nuevas medidas.

* Proporcionar soporte a los estados miembros mediante colaboración con los organismos competentes.

* Desarrollar posiciones oficiales a través de publicaciones en temas científicos, legales de regulación y a nivel ético referentes al ámbito de la RA en la Directiva.

Uno de los temas importantes que se trata en esta directiva es la calidad

del aire de los establecimientos de tejidos y células. A pesar de que las primeras propuestas eran altamente exigentes en cuanto a la necesidad de trabajar con calidad de aire de tipo A, este requerimiento ha sido eliminado de los anexos de la Directiva.

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta es que la normativa obliga a disponer de un sistema de control de calidad en los establecimientos de tejidos y células, hasta ahora no prescriptivo en los laboratorios de Reproducción Asistida ni en los bancos de gametos, tejido germinal o embriones.

Contrariamente a lo que se pueda pensar, hay puntos muy positivos en esta Directiva: 1) el control de calidad que gobernaría el proceso y su implementación permitiría mediante la sistematización del trabajo, la identificación y eliminación o minimización de factores adversos; 2) el análisis de los riesgos tanto para los trabajadores como para los gametos y embriones y su adecuado manejo, permitiría un regulación mucho más eficaz que la basada en medidas arbitrarias; y 3) los riesgos y beneficios percibidos, tanto técnicos como biológicos, se analizarían y contrastarían con los datos actuales, permitiendo un análisis de la calidad mucho más preciso.

La Directiva, por tanto, plantea una necesidad y pretende resolverla garantizando la seguridad de los tratamientos de reproducción asistida. Es imprescindible que los centros de RA de nuestro país sean conscientes de los cambios que puede suponer la implementación de esta normativa en la práctica diaria. A pesar de que la fecha de cumplimiento obligatorio se había establecido en Mayo de 2007, es posible que esta fecha se retrase al no estar listo todavía el segundo

documento de requerimientos técnicos.

Los firmantes de este artículo junto con la Dra. Blanca Miranda de la Organización Nacional de Transplantes (ONT) (autoridad competente en España en la implementación de la Directiva) son los representantes españoles en la EACC. Tanto la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) como la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), a los que mantendremos debidamente informados, deben jugar un importante papel en el proceso de implementación de esta normativa, sobretodo a la hora de proporcionar a sus asociados la información necesaria para su correcta interpretación y cumplimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Department of Health 2001. A code of practice for tissue banks providing tissues of human origin for therapeutic purposes. Department of Health, London, 26 páginas.

Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 of March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. Official Journal of the European Union, L 102/48.

Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. RBM Online 2005; 11: 162-1761



MediCult

Medios de cultivo para FIV, ICSI, congelación
y descongelación de blastocistos, espermatozoides...



Distribuido por: **C.B.F. LETI, S.A.**

Gran Via Corts Catalanes, 184
08036 BARCELONA
Tel. 93 394 53 91 Fax: 93 394 53 80
E-Mail: diagnostics@leti.com

Sol. 5
28760 TRES CANTOS (Madrid)
Tel. 91 803 59 60
Fax: 91 804 09 19

ORGANIZACIÓN Y RECURSOS FÍSICOS EN LOS LABORATORIOS DE FIV DE LOS CENTROS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: ENCUESTA NACIONAL

Organization and physic resurces in IVF laboratories from assited reproduction centers: national poll

Carolina González-Varea¹, Jesús Aguilar², Carmen Fernández³, Antonio Garrido⁴, María Sánchez⁴, María Hernández⁴, Sonia Calderón⁴, Rocío Martínez⁵, José Antonio Castilla⁴.

¹H.U. La Paz, Madrid. ²Clínica Avicena, Jaén; ³U. Reproducción, Clínica Santa Elena, Málaga, ⁴U. Reproducción, H.U. Virgen de las Nieves Granada y ⁵ Clínica D. Enciso, Puerto Santa María, Cádiz.

RESUMEN: Con objeto de conocer cuáles son los recursos físicos y cómo se organizan los laboratorios que hacen FIV en los centros de reproducción nacionales se elaboró y distribuyó una encuesta no anónima con veintiocho preguntas que versaban sobre actividad, recursos técnicos y espacios físicos. La encuesta se publicó en la revista y en la página web de ASEBIR. De los centros españoles, contestaron a la encuesta 21 laboratorios, lo que supone aproximadamente un 10% de tasa de respuesta del total; de los cuales 5 (24%) tenían exclusivamente prestación pública y el resto (76%) tenían prestación privada. Los datos recogidos son de los ciclos realizados en el año 2003. De los laboratorios participantes, el 80-90% poseen un sistema de filtrado de aire para la incubadora, tienen un generador de energía de emergencia y usan pipetas automáticas. El 81% de los centros poseen un área diferenciada para el laboratorio de andrología del laboratorio de FIV/ICSI. En el 76,5% de los centros los laboratorios están próximos al lugar donde se realiza la recuperación de ovocitos. Y aproximadamente el 72% tenían zonas específicas de obtención y recepción de las muestras de semen. En el 66% de los centros realizan un almacenamiento de semen y embriones en contenedores independientes. El 60% posee un sistema de filtrado de aire del laboratorio de FIV independiente. Y en el 33% se pipetea con la boca. De los 7 laboratorios (33%) que atienden a pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles, 4 tienen contenedores independientes para estos pacientes. El número medio de ciclos de FIV/ICSI por incubador de CO₂ fue 158, por equipo de micromanipulación 274 ciclos y por cabina de flujo laminar fue 233. Los resultados comentados se comparan entre centros públicos y privados. Podemos concluir que existe una alta variación en el grado de cumplimiento de las recomendaciones de las diferentes sociedades científicas respecto a los recursos físicos de los laboratorios de Reproducción Asistida nacionales. El análisis de estos datos creemos que es el punto de partida para una adecuada planificación de los laboratorios de reproducción asistida.

Palabras Clave: Recursos Físicos, Organización de los Laboratorios, Actividad asistencial.

ABSTRACT: In order to know which are the physic resources and how IVF laboratories are organized in national reproduction centres, we elaborated and distributed a non anonymous opinion poll with twenty-eight questions about activity, technical resources and physic spaces. The poll was published in ASEBIR journal and web. Twenty-one laboratories of the Spanish centres answered the poll, which means approximately a 10% of the total answering rate; A 24% had public service exclusively and the rest (76%) had private services. The collected data comes from cycles carried out in 2003. From the participating laboratories, 80-90% have an air filtration system for the incubator, an emergency energetic generator and use automatic pipettes. An 81% of the centres have a differentiated area for the andrology laboratory of IVF/ICSI laboratory, and 76,5% of them are situated near the oocyte recovery area. Approximately 72% of the centres have specific areas for reception and recollection of semen. A 66% of the centres store semen and embryos in independent containers. An independent air filtration system in IVF laboratories is possessed in 60% of the centres. A 33% pipettes with the mouth. Of the 7 laboratories (33%) that attends patients with infectious diseases, 4 have independent containers for these patients. The mean numbers of FIV/ICSI cycles by CO₂ incubator was 158 cycles, by micromanipulation equipment was 274 cycles and by flow laminar cabinet 233 cycles. The discussed result are compared between public and private centres. We can conclude that there are a high variation between the grade of observance of the recommendations of scientific societies and the physic resources of national assisted reproduction laboratories. We believe that these data analysis is the starting point for an adequate planning of assisted reproduction laboratories.

Key words: physic resources, laboratory organization, asistencial activity.

INTRODUCCIÓN

Diferentes sociedades científicas han editado recomendaciones sobre organización, seguridad y recursos físicos y humanos necesarios en los laboratorios de reproducción humana (Núñez y Suárez, 2003; Aguilar et al., 2004). Recientemente, a nivel nacional la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR, 2006) y la Sociedad Española de Fertilidad (SEF, 2006) han editado recomendaciones sobre este tema. No obstante, se han descrito grandes discrepancias a la hora de aplicar las recomendaciones de sociedades científicas en los centros de reproducción, tanto a nivel de recursos humanos (Gonzalvo et al., 2001; Núñez et al., 2002) como en aspectos clínicos (Conrad et al., 1996).

A la hora de establecer las necesidades físicas de cualquier laboratorio es fundamental conocer el volumen de actividad con el objeto de dimensionar éste al nivel de actividad (Castilla et al., 2001). Por otra parte, es fundamental tener en cuenta en los laboratorios de reproducción determinadas peculiaridades (escasa automatización, imposibilidad de programación de actividad) que van a influir en su organización y necesidad de recursos físicos. Todos estos elementos serán claves para la implantación de sistemas de calidad en los laboratorios de reproducción (Wikland and Sjöblom, 2000). Cualquier propuesta de planificación de recursos físicos hace necesario un análisis previo de la situación actual, con el objeto de delimitar puntos críticos donde centrar nuestra actuación.

En este trabajo presentamos los resultados de una encuesta realizada a profesionales del laboratorio de reproducción que realizan FIV con el objeto de conocer la estructura física y equipos de cada laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó una encuesta no anónima con veintiocho preguntas que versaban sobre actividad, recursos técnicos

y espacios físicos. La encuesta se publicitó en la revista y página WEB de ASEBIR. Respondieron a la encuesta 21 centros. Los aspectos sobre los cuales se solicitó información fueron: Nombre del Centro; tipo de prestación (pública o privada); número de ciclos FIV/ICSI que realizaron en el año 2003; si atiende a parejas con enfermedades infecciosas transmisibles; si hay proximidad entre el laboratorio de embriología y el habitáculo donde se realiza la recuperación de ovocitos, y si poseen equipos móviles de transporte de ovocitos y embriones en caso de laboratorio y zona de punción alejadas; si están diferenciados el laboratorio de FIV del laboratorio de andrología; si utilizan sistema de análisis automático de semen; si existen zonas específicas de obtención y recepción de las muestras de semen; la facilidad de acceso para la limpieza de todo el laboratorio de embriología; presencia de un generador de energía de emergencia; si utilizan pH-metro; conocimiento de que tipo de aporte de gas reciben las incubadoras y tipo de filtro; tipo de cabina de flujo laminar que hay en el laboratorio, y número de inspecciones; número de contenedores de nitrógeno líquido; si existen contenedores de nitrógeno líquido exclusivos para semen en cuarentena, embriones y pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles; si se utiliza algún sistema de pipeteo con la boca y uso de pipetas automáticas; número de contenedores de nitrógeno líquido; número de microscopios con sistema de micromanipulación del laboratorio de FIV; calibraciones anuales de material, y existencia o no de sistema de filtración de aire.

Con toda esta información se procedió a la recogida de los datos en una tabla del programa estadístico Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, USA), calculándose algunos índices como número medio de ciclos de FIV/ICSI por: incubadora, cabina de flujo laminar, equipo de micromanipulación o bombonas de almacenamiento de material biológico crioconservado.

Todas las variables se calcularon para centros públicos (5) y privados

(16). A las variables cualitativas se les hizo un análisis estadístico básico obteniendo los porcentajes de cada categoría analizada; las variables de tipo cuantitativo fueron analizadas con estadística descriptiva (media, mediana, mínimo y máximo).

RESULTADOS

De los centros españoles, contestaron a la encuesta 21 laboratorios, lo que supone aproximadamente un 10% de tasa de respuesta del total de centros autorizados en España (203 centros). En cuanto al tipo de prestación de los centros encuestados, 5 (24%) tenían prestación pública exclusivamente y el resto, 16 (76%) tenían prestación privada.

En cuanto al laboratorio de Andrología comentar que el 81% de los centros poseen un área diferenciada para el laboratorio de andrología del laboratorio de FIV/ICSI, siendo ese porcentaje superior en los centros públicos que en los privados (100% versus 63%, respectivamente). Aproximadamente el 72% de los laboratorios participantes tienen zonas específicas de obtención y recepción de las muestras de semen, siendo ese porcentaje superior en los centros privados. Aproximadamente el 66% de los centros realizan un almacenamiento independiente de semen y embriones en contenedores de nitrógeno, contando con bombonas de cuarentena el 24% de los laboratorios. De los 7 laboratorios que atienden a pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles, 4 tienen contenedores independientes para estos pacientes (Tabla I). Sólo aproximadamente un 10% posee un sistema de análisis automático de semen.

Respecto al laboratorio de Embriología destaca que el 24% de los laboratorios de embriología encuestados están alejados del habitáculo donde se realiza la recuperación de ovocitos, teniendo todos estos laboratorios equipos móviles de transporte de ovocitos y embriones. El 80-90% de los centros poseen un sistema de filtrado de aire para la incubadora, tienen un generador de

TABLA I: LABORATORIO ANDROLOGÍA Y PAREJAS CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMISIBLES

	CENTROS PÚBLICOS	CENTROS PRIVADOS	TOTAL
Están diferenciados el laboratorio de FIV del laboratorio de andrología.	100% 5/5	62,5% 12/16	81% 17/21
Sistema analizador automático de semen	20% 1/5	6,3% 1/16	9,5% 2/21
Existen zonas específicas de obtención y recepción de las muestras de semen	40% 2/5	81,3% 13/16	71,4% 15/21
Existen contenedores de nitrógeno líquido exclusivos para semen en cuarentena	20% 1/5	25% 4/16	23,8% 5/21
Almacenamiento independiente de semen y embriones	60% 3/5	68,7% 11/16	66,7% 14/21
Atiende a parejas con enfermedades infecciosas transmisibles	20% 1/5	37,5% 6/16	33,3% 7/21
Contenedores de nitrógeno líquido exclusivos para pacientes con enfermedades infecciosas transmisibles	100% 1/1	50% 3/6	19% 4/21

Tabla II: ASPECTOS ORGANIZATIVOS Y DE CONTROL DE CALIDAD

	C.PÚBLICO	C. PRIVADOS	TOTAL
Proximidad entre el laboratorio de embriología y el habitáculo donde se realiza la recuperación de ovocitos.	100% 5/5	68,8% 11/16	76,5% 16/21
Equipos móviles de transporte de ovocitos y embriones en caso de laboratorio y zona de punción alejadas.	-	100% 5/5	100% 5/5
Presencia de un generador de energía de emergencia.	80% 4/5	81,3% 13/16	81% 17/21
Posee pH-metro.	80% 4/5	31,3% 5/16	42,9% 9/21
Sistema de válvulas intercambiables en las bombonas de CO2	40% 2/5	75% 12/16	75% 12/16
Posee filtro de aire para la incubadora	100% 5/5	81,3% 13/16	85,7% 18/21
Tipo de cabina de flujo laminar	100% HORZ.	HORZ. 56,3% (3/16) AMBAS 25% (4/16)	HORZ. 66,6% (14/21) AMBAS 19,1% (4/21)
Uso de pipeteo con la boca	20% 1/5	37,5% 6/16	33,3% 7/21
Uso de pipetas automáticas	100% 5/5	87,5% 14/16	90,5% 19/21
Sistema de filtración de aire	40% 2/5	68,7% 11/16	61,9% 13/21

energía de emergencia y usan pipetas automáticas, siendo todo lo anterior similar en centros públicos y privados. Un 66% de laboratorios posee un sistema de válvulas intercambiables de las bombonas de gas que reciben las incubadoras. En cuanto al tipo de

cabina de flujo laminar, se observa más frecuentemente cabinas de flujo laminar vertical en los centros privados y sistemas de filtrado de aire del laboratorio de FIV independiente. Y en el 33% del total de laboratorios se pipetea con la boca (Tabla II).

Si consideramos las calibraciones de material al año obtenemos valores medios de 1,2 calibraciones (de 0 de mínima y 2 de máxima) en los centros participantes. Y de 1,1 inspecciones de cabina de flujo laminar por año (1-2 anuales). El número medio

de sistemas para calibrar el CO₂ y Temperatura de los incubadores que poseen los centros fue de 1,2 (1 o 2 por laboratorio).

En la **Tabla III** se presentan la acti-

vidad que soportan los distintos equipos del laboratorio de FIV/ICSI por año en los distintos centros. El número de ciclos/año por cada equipo de micromanipulación y por cada contenedor de nitrógeno líquido, fue simi-

lar entre centros públicos y privados. Sin embargo, el número de ciclos/año por incubadora de CO₂ y por cabina de flujo fue superior en los centros públicos que en los privados.

Tabla III: ACTIVIDAD SOPORTADA POR APARATO EN LOS LABORATORIOS NACIONALES DE REPRODUCCIÓN

	CENTROS PÚBLICOS	CENTROS PRIVADOS	TOTAL
Número de ciclos FIV/ICSI realizados en 2003	328 (256) (214-537)	380 (320) (74-1101)	380 (320) (74-1101)
Número de ciclos por equipo de micromanipulación	274 (256) (214-380)	274 (270) (74-500)	274 (256) (74-500)
Número de ciclos por incubadores de CO ₂	189 (190) (190-268,5)	148 (130) (37-446,5)	158 (142) (37-446)
Número de ciclos por cabina de flujo	290 (256) (190-537)	216 (227) (74-349)	233 (235) (74-537)
Número de ciclos por contenedores de nitrógeno líquido	72,1 (71,3) (63,3-85,3)	76,7 (54) (31,5-174)	83,5 (63) (31,5-174)

Media (Mediana) (Mínimo-Máximo)

DISCUSIÓN

La participación obtenida en esta encuesta fue escasa, ya que 21 centros representan algo más del 10% de los centros autorizados para FIV por el Ministerio de Sanidad y Consumo. No obstante, ha quedado reflejada perfectamente el porcentaje real de centros públicos frente a privados, ya que del total de centros autorizados en España el 19% pertenecen a la sanidad pública (Ministerio Sanidad y Consumo, 2003) porcentaje similar al de centros públicos que participaron en nuestra encuesta (24%).

A pesar de que todas las Sociedades Científicas que han editado guías sobre laboratorio de reproducción (LARA, 1998; ASRM, 2002; Gianaroli et al., 2000; ACE, 2003; NAMSI, 2002; FSA, 2001; CAP, 2002; NFS, 2002; ASEBIR, 2006) recomiendan proximidad entre el laboratorio de embriología y el área de punción folicular, un 25% de los

laboratorios participantes no cumplían dicha recomendación. No obstante, estos laboratorios poseían todos equipos móviles de transporte de material biológico reproductivo, tal como recomiendan distintas Sociedades Científicas (ASRM, 2002; Gianaroli et al., 2000; ACE, 2003; FSA, 2001; CAP, 2002; ASEBIR, 2006). De igual manera, un 20% de los centros no siguen la recomendación (ASRM, 2002; Gianaroli et al., 2000; NAMSI, 2002; FSA, 2001; NFS, 2002; ASEBIR, 2006) de diferenciar el laboratorio de FIV del de Andrología.

Parece existir una mayor disponibilidad de espacio físico en los centros públicos que privados, como lo demuestra el hecho de que el porcentaje de centros con laboratorio de andrología y embriología separados y de centros con laboratorios próximos

a los lugares de punción sea mayor en los públicos que en los privados. Sin embargo, la privacidad de los pacientes parece mantenerse más en los centros privados pues solo el 40% de los centros públicos, frente al 80% de los privados poseía zonas específicas de obtención y recepción de las muestras de semen.

El sistema de filtrado de aire en el laboratorio de reproducción es esencial para todas las Sociedades Científicas (LARA, 1998; ASRM, 2002; Gianaroli et al., 2000; ACE, 2003; NAMSI, 2002; FSA, 2001; CAP, 2002; NFS, 2002; ASEBIR, 2006), sin embargo un 20% de los laboratorios participantes contestó no poseerlo, porcentaje similar al de laboratorios que no siguen la recomendación de tener generador de energía de emergencia (Gianaroli et al., 2000; ACE, 2003; NAMSI,

2002; CAP, 2002; ASEBIR, 2006). El número medio de ciclos que soportan cada equipo en los distintos centros de reproducción no superó a lo recomendado por ASEBIR (2006). Sin embargo, el hecho de que la carga de trabajo por incubadora o cabina de flujo laminar sea un 20% mayor en los centros públicos que en los privados, sugiere, que los centros privados están mejor dotados en aparataje que los públicos. La influencia de estas diferencias en los resultados es desconocida.

En cuanto al cumplimiento de normas de seguridad biológica, llama la atención que en un tercio de los laboratorios se pipetea con la boca, pues dicha práctica es desaconsejada (FSA, 2002) o prohibida (CAP, 1998; ASRM, 2002; ACE, 2003) por diferentes Sociedades Científicas. Otras guías sobre laboratorio de reproducción, si bien, no lo prohíben expresamente, recomiendan el uso del pipeteo mecánico (Gianaroli et al., 2000; NFS, 2002). De igual manera, no parece seguirse totalmente en los laboratorios nacionales la recomendación realizada por diferentes sociedades (Gianaroli et al., 2000; ACE, 2003; ASRM, 2004; ASEBIR, 2006) e incluida en la Directiva 2006/17/CE de la Comisión Europea de 8 de Febrero de 2006 sobre Banco de tejidos de almacenar el material biológico reproductivo de parejas con enfermedades infecciosas transmisibles en contenedores independientes, pues de los 7 centros que atienden a estas parejas solo 4 disponen de estas bombonas para almacenamiento independiente.

Desconocemos si esta encuesta es representativa de la situación real de los laboratorios de reproducción nacionales, pues pudiera ser que estuviera sesgada al existir la posibilidad de que los mejores laboratorios sean los que tiendan a participar en este tipo de estudios, y que laboratorios menos dotados participen en menor proporción por miedo a mostrar sus deficiencias. Además esta encuesta estaba encaminada hacia centros que hicieran FIV, desconociendo si alguna de las conclusiones obtenidas pueden extrapolarse a cen-

tros que solo realizan inseminación artificial. Sería interesante conocer la evolución de los recursos físicos en los laboratorios de reproducción nacionales, en especial tras la reciente edición de las recomendaciones para el laboratorio de reproducción de ASEBIR (ASEBIR, 2006).

BIBLIOGRAFÍA

ACE, Accreditation Standards and guidelines for IVF laboratories. Clinical pathology Accreditation (UK), 2003 www.ivf.net/ace/accred.htm.

Aguilar J, Castilla JA, Magan R, Ortiz A, González E, Ortiz-Galisteo JR, Peralta L. Recursos físicos en el laboratorio de Reproducción Asistida. Análisis Comparativo de Guidelines de Sociedades Científicas. Rev. ASEBIR 2004; 9:24-6.

ASEBIR, Recomendaciones sobre recursos humanos y físicos para el laboratorio de reproducción. Cuadernos de Embriología Clínica. Ed. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, 2006.

ASRM, Revised minimum standards for in vitro fertilization, gamete intrafallopian transfer, and related procedures. American Society of Reproductive medicine, 2002. www.asrm.org.

ASRM, The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Hepatitis and Reproduction. Fertil Steril 2004; 82:1754-64.

CAP, College of American Pathologist . Reproductive laboratory: proposed CAP check list 1998. www.cap.org.

Castilla JA, Núñez AI, Suárez I, Clavero A, García ML. "Dimensión" del laboratorio de FIV. Boletín SEF 2001;10:9-10.

Conrad EA, Fine B, Hecht BR, Pergament E. Current practices of commercial cryobanks in screening prospective donors for genetic disease and reproductive risk. Int J Fertil Menopausal Stud 1996; 41:298-303.

Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, De Vos A, et al., ESRHE guidelines for good practice

in IVF laboratories. Hum Reprod 2000; 15-10:2241-46.

FSA, The Fertility Society of Australia Reproductive Technology Accreditation Committee, Code of practice for centres using assisted reproductive technology (RTAC). Abril 2002. www.fsa.au.com/rtac.

Gonzalvo MC, Vergara F, Yoldi A, Carrión M, Muñoz M, Castilla JA, Ramírez JP. Organización de un laboratorio de reproducción. Aspectos legales sobre el personal adscrito. Rev. ASEBIR 2001; 2:34-36.

LARA, Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Manual de procedimientos laboratorio de reproducción asistida.1998. www.redlara.com/esp/pec_database.asp

Ministerio Sanidad y Consumo, Centros de Reproducción Asistida, 2003, <http://www.msc.es/ciudadanos/prescripciones/centrosServiciosSNS/centroReproHumAsist.htm>

NAMSI, National Academy of Medical Sciences of India. National Guidelines for accreditation, supervision and regulation of ART clinics in India.2002. www.icmr.nic.in.

NFS, Nordic Fertility Society, Quality Guide. Checklist for ART clinic and ART laboratory, 2002 www.nordicfs.org.

Núñez AI, García ML, Blanco M, Fernández A, Ardoy M, Bassas L, Castilla JA. Organización y recursos humanos de los laboratorios de FIV de los centros del SNS. Rev. ASEBIR 2002; 7(1): 25-30.

Núñez AI, Suárez II. Seguridad en el Laboratorio de Embriología Clínica: análisis comparativo de diferentes "guidelines" de Sociedades Científicas. En Seguridad Biológica en el Laboratorio de Reproducción Asistida. Eds: Castilla JA, Magán R. Granada: Gráficas Fernando, 2003.

SEF, Recomendaciones sobre recursos humanos y físicos para el estudio y tratamiento de la pareja estéril. Sociedad Española de Fertilidad, 2006

Wikland M, Sjöblom C. The application of quality systems in ART programs. Moll Cell Endocr 2000; 166: 3-7.

NUEVOS AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DEL DNA ESPERMÁTICO

New advances in the study of sperm nuclear DNA integrity

Juan G. Álvarez.

Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN, La Coruña. Instituto Marqués, Barcelona. Harvard Medical School, Boston, MA

Resumen: La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término tanto *in vivo* como *in vitro*. La presencia en el genoma del embrión de roturas en las cadenas del DNA y/o modificaciones a nivel de nucleótidos del DNA provenientes del genoma paterno, que pueden ser reparadas o no por el ovocito tras la fecundación, no es compatible con un desarrollo embrionario y fetal normal. Recientemente se ha demostrado que la fragmentación del DNA espermático es una causa potencial de infertilidad de causa desconocida. En esta revisión, los mecanismos responsables de fragmentación de DNA en espermatozoides humanos, incluyendo la apoptosis en el epitelio de los túbulos seminíferos durante el proceso de espermatogénesis, defectos en el remodelado de la cromatina durante la espermiogénesis, el daño inducido por radicales libres (ROS) durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo, la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas y el daño inducido por la quimio y radioterapia, serán discutidos. Además, los diferentes tipos de tests utilizados para determinar la fragmentación del DNA espermático y sus aplicaciones al diagnóstico y tratamiento de la infertilidad, serán descritos. Por último, se plantearán preguntas frecuentemente formuladas sobre tests de fragmentación de DNA.

Palabras clave: fragmentación de DNA, fecundación *in vitro*, radicales libres, estrés oxidativo, caspasas, endonucleasas, quimioterapia, radiación ionizante.

Abstract: *The integrity of the paternal genome is of paramount importance in the initiation and maintenance of a viable pregnancy in vivo and in vitro. The presence in the embryonic genome of DNA strand breaks and/or modifications at the level of DNA nucleotides coming from the paternal genome, that have not been repaired by the oocyte after fertilization, is not compatible with normal embryo and fetal development. DNA fragmentation in human spermatozoa has been recently shown to be a potential cause of unexplained infertility. In this review, the mechanisms responsible for DNA fragmentation in human sperm, including apoptosis in the seminiferous tubules epithelium, defects in chromatin remodeling during the process of spermiogenesis, and oxygen-radical (ROS)-induced DNA damage during sperm migration from the seminiferous tubules to the epididymis, the activation of sperm caspases and endonucleases and damage induced by chymo and radiotherapy, are discussed. Also the different tests used to determine DNA fragmentation in human sperm and their applications to the diagnosis and treatment of infertility, are presented. Finally, answers to frequently asked questions about DNA fragmentation testing are also included.*

Key words: *DNA fragmentation, in vitro fertilization, oxygen radicals, oxidative stress, caspases, endonucleases, chemotherapy, ionizing radiation.*

Introducción

La integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a término tanto *in vivo* como *in vitro*. Espermatozoides con DNA dañado pueden fecundar ovocitos en metafase II con la misma eficacia que espermatozoides con DNA intacto (Aitken et al., 1998). Sin embargo, la presencia en el embrión de ciertas modificaciones a nivel de nucleótidos y/o fragmentación en las cadenas del DNA procedentes del complemento genómico paterno (que no hayan sido repa-

radas por el ovocito después de la fertilización), es incompatible con un desarrollo embrionario y fetal normal.

Se estima que un 25% de las causas de infertilidad masculina son de origen idiopático. La etiología de algunas de estas causas podría estar relacionada con daño de DNA en los espermatozoides. Sin embargo, este daño podría ser reparado por el ovocito después de la fecundación. Esto va a depender sobre todo (i) de la calidad citoplasmática y genómica del ovoci-

to, y (ii) del grado de daño en las cadenas de DNA del espermatozoide que haya fecundado al ovocito. Dado que la capacidad del ovocito de reparar este tipo de daño disminuye con la edad y que, al mismo tiempo, el nivel de fragmentación de DNA en los espermatozoides aumenta, ello podría explicar, al menos en parte, la disminución significativa en la tasa de embarazo que se observa en parejas de edad avanzada. Este tipo de daño en las cadenas de DNA podría encontrarse en embriones con un comple-

mento cromosómico normal. Es decir, la presencia de daño de DNA no reparado por encima de un umbral crítico en embriones generados tanto *in vivo* como *in vitro*, podría explicar el paro en el desarrollo embrionario que se produce tras la implantación de embriones con un cariotipo normal. Estudios recientes sugieren que este tipo de daño se expresa a partir del día 3 de desarrollo embrionario y ha sido caracterizado como *late paternal effects* (Tesarik et al., 2004).

Cabría puntualizar que el daño de DNA que pudiera encontrarse en el embrión no tiene por qué estar exclusivamente relacionado con el daño de DNA en el espermatozoide que haya fecundado al ovocito. Este daño podría provenir también del ovocito ó de ambos. Sin embargo, dado que (i) el análisis de fragmentación de DNA en gametos es destructivo, (ii) este daño podría variar de un ovocito a otro, y (iii) el número de ovocitos es limitado, esto no nos ha permitido estudiar hasta ahora la presencia de esta patología en ovocitos. En cambio, el uso de pruebas que permitan el estudio del grado de fragmentación de DNA (especialmente cuando se trata de daño de DNA de cadena doble) en blastómeras de embriones obtenidas para Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), podría aplicarse al estudio de la integridad de la cromatina embrionaria. El uso combinado de PCR, de sondas cromosómicas y de tests de fragmentación de DNA nos permitiría estudiar de forma simultánea la presencia de enfermedades monogénicas, aneuploidías y el grado de fragmentación de DNA en el embrión permitiéndonos así seleccionar los embriones de mejor calidad genómica.

Mecanismos de fragmentación de DNA en espermatozoides

¿Cómo se produce la fragmentación de DNA en los espermatozoides? El daño de DNA en los espermatozoides puede afectar tanto el DNA mitocondrial como el nuclear y puede ser inducido por cinco mecanismos principales: (i) apoptosis durante el proceso de espermatogénesis, (ii) roturas de DNA o *nicks* producidos durante el

remodelado de la cromatina que tiene lugar durante el proceso de espermiogénesis, (iii) fragmentación de DNA a nivel post-testicular inducida por ROS y caspasas/endonucleasas durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo, (iv) fragmentación de DNA inducida por caspasas y endonucleasas espermáticas, y (v) fragmentación de DNA inducida por radio y quimioterapia. De estos cinco mecanismos, quizás en el que juega un papel más importante sea la fragmentación de DNA a nivel post-testicular durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Esto viene avalado por estudios previos que demuestran que la fragmentación de DNA es más alta en espermatozoides del epidídimo (Steele et al., 1999) y eyaculados (Greco et al., 2005; Ollero et al., 2001) que en espermatozoides testiculares (Greco et al., 2005).

1. Inducción de apoptosis durante el proceso de espermatogénesis. Durante el proceso de espermatogénesis tiene lugar un *screening* celular importante que resulta en la inducción de apoptosis en un 50-60% de las células germinales que entran en la meiosis I. Estas células *earmarked* con marcadores apoptóticos tipo Fas deberían ser fagocitadas y eliminadas por la célula de Sertoli a la cual se encuentran asociadas (Billig et al., 1996; Pentikainen et al., 1999; Sakkas et al., 1999). Sin embargo, esto no siempre va a ocurrir y un porcentaje variable de estas células germinales entran en el proceso de remodelado celular de la espermiogénesis (que es el que determina la morfología espermática) apareciendo posteriormente en el eyaculado. Con relación a este proceso de *screening* fallido, los resultados de un estudio reciente sugieren que existe una disociación entre la calidad genómica de la célula germinal y el remodelado espermático que tiene lugar durante la espermiogénesis (Burrello et al., 2004). Es decir, una célula germinal puede tener el núcleo "pulverizado" por apoptosis o ser aneuploide y sin embargo el espermatozoide resultante tener una morfología normal. De ahí que cuando se microinyecta un espermatozoide de morfología normal, esto no nos garantiza que el genoma sea normal. Lo que

si se ha constatado es que cuando existe oligospermia, la probabilidad de que un espermatozoide con morfología normal sea aneuploide es mucho mayor que si existe normozoospermia (Burrello et al., 2004). Esto probablemente esté relacionado con un bloqueo madurativo parcial asociado a alteraciones meióticas. Por último, el hecho de que un porcentaje variable de espermatozoides en el eyaculado expresan marcadores apoptóticos del tipo de Fas, fosfatidilserina, Bcl-XL, p53 (Sakkas et al., 2002) podría utilizarse para seleccionar espermatozoides no apoptóticos en muestras de semen. Un método desarrollado recientemente en esta dirección es el utilizado para separar espermatozoides apoptóticos de espermatozoides no-apoptóticos mediante el uso de las columnas de *ANnexin-conjugated MicroBeads (ANMB Microbead Kit, Miltenyi Biotec, Germany)*. El principio en el que están basadas estas columnas es que los espermatozoides apoptóticos expresan fosfatidilserina en la hemicapa externa de la membrana y se unen a la anexina V. Al aplicar un campo magnético a las columnas, los espermatozoides unidos a la anexina V conjugada con las micropartículas magnéticas serían retenidos en la columna, mientras que los no-apoptóticos pasarían a través de la misma (Grunewald et al., 2001). Otro método, quizás más específico, sería la selección de espermatozoides apoptóticos por técnicas de inmuoadsorción fase sólida mediante el uso de anticuerpos anti-Fas adheridos a placas de Petri.

2. Roturas de DNA durante el proceso de espermiogénesis. Alteraciones en el proceso de remodelado de la cromatina espermática durante la espermiogénesis podrían resultar en fragmentación de DNA. McPherson y Longo han postulado que la presencia de roturas en el DNA podría ser indicativa de maduración incompleta durante la espermiogénesis. Para que se produzca el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide, es necesaria la actividad de nucleasas endógenas que corten y ligen el DNA durante su protaminación. Estos cortes proporcionarían una liberación de estrés torsional ayudando así al empa-

quetamiento de la cromatina durante el desplazamiento de las histonas por las protaminas (McPherson and Longo, 1992, 1993a, 1993b). Alteraciones en el control de este proceso podrían resultar en roturas de DNA no reparadas. Estas alteraciones se producirían antes de la espermiación.

3. Fragmentación de DNA a nivel post-testicular. Estudios recientes demuestran que espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de ROS pueden inducir daño de DNA en espermatozoides maduros. Este daño se produciría después de la espermiación durante la co-migración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo (Ollero et al., 2001). Dado que los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto en el epidídimo, y que la vida media de los ROS es del orden de nano a microsegundos, esto facilitaría el que los ROS induzcan fragmentación de DNA a nivel del epidídimo, ya sea actuando directamente sobre el DNA o bien indirectamente mediante la activación de endonucleasas y caspasas espermáticas. Esto es consistente con el hecho de que la co-centrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen niveles elevados de ROS) con espermatozoides maduros resulta en la inducción de fragmentación de DNA en estos últimos, ya que en estas condiciones estos espermatozoides también se encontrarían en íntimo contacto (Twigg et al., 1998). Esto también es consistente con el hecho de que la exposición in vitro de espermatozoides maduros a ROS resulta en daño significativo de DNA (Aitken et al., 1998; Lopes et al., 1998). Por otra parte, el mismo epidídimo podría también jugar un papel activo a la hora de inducir fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por el mismo, ya sea producido por radicales libres como el anión superóxido (Britan et al., 2006), el radical hidroxilo o el óxido nítrico, o bien mediante la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por agentes tóxicos o por factores epididimarios. En el primer caso, este tipo de daño podría prevenirse mediante el uso de agentes antioxidantes, mientras que en el

segundo caso este tratamiento carecería de eficacia. Esto viene avalado por los resultados recientemente publicados por Greco et al., donde el uso de antioxidantes produjo una reducción significativa en los niveles de fragmentación de DNA (Greco et al., 2005).

Probablemente, los espermatozoides que expresen un mayor daño de DNA sean aquellos que adquieran un menor grado de *crosslinking* de puentes disulfuro en la cromatina espermática durante su maduración en el epidídimo. En este sentido, estudios recientes han demostrado que, en general, el grado de fragmentación de DNA en espermatozoides eyaculados es más alto que en espermatozoides testiculares (Greco et al., 2005; Steele et al., 1999) y que en espermatozoides del cuerpo y cabeza del epidídimo (que es donde se completa el proceso de *crosslinking*) y que la inducción de fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por el epidídimo podría estar relacionada con la calidad genómica del espermatozoide. Es decir, además del mecanismo de *screening* de la célula de Sertoli, al que hacíamos referencia antes, existiría otro mecanismo de *screening* a nivel del epidídimo dirigido a eliminar espermatozoides genómicamente defectuosos (Suganuma et al., 2005).

El daño potencial de DNA que los espermatozoides pueden experimentar a su paso por el epidídimo tiene una gran trascendencia clínica, ya que en casos de niveles elevados de fragmentación de DNA en semen y fallo en dos o más ciclos de FIV/ICSI, podría recurrirse a la microinyección de espermatozoides testiculares obtenidos mediante técnica de TESA o TESE (preferiblemente TESA, dado que es menos invasiva y gozaría de una mayor aceptación por parte del paciente y del ginecólogo). Esto viene avalado por los resultados obtenidos en un estudio publicado por Greco et al., donde la microinyección de espermatozoides testiculares en pacientes con un nivel de fragmentación de DNA en semen >15%, medido por el test TUNEL, resultó en una tasa de embarazo del 44,4%, mientras que con

espermatozoides eyaculados la tasa de embarazo evolutivo fue del 0% (Greco et al., 2005).

Cabe destacar que la fragmentación de DNA inducida por el radical hidroxilo resulta en la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina en un primer estadio seguido de fragmentación de DNA de cadena doble (Cui et al., 2000). Mientras que el daño de DNA del primer tipo pudiera ser reparado por el ovocito, la fecundación de un ovocito por un espermatozoide con fragmentación de DNA de cadena doble es prácticamente irreversible e incompatible con el desarrollo de un embarazo a término. Dado que valores de fragmentación de DNA en espermatozoides eyaculados >20%, medidos por TUNEL (Sergerie et al., 2005), o >30%, medidos por el test SCSA (Evenson et al., 1999), están asociados a tasas de embarazo <5%, la pregunta que surge es que ocurre con el 80% y 70% restante de los espermatozoides. En estos casos, la probabilidad de que un espermatozoide con un DNA normal fecunde al ovocito debería de ser del 80% y 70%, respectivamente y no <5%. Sin embargo, además de que un 20% y 30% de los espermatozoides tengan roturas en la cadena de DNA, el resto de los espermatozoides podrían tener modificaciones en las bases de DNA del tipo de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina. Por lo tanto, la probabilidad de que un espermatozoide con DNA normal fecunde al ovocito sería mucho más baja que la esperada con un valor de fragmentación de DNA del 20% o 30%, respectivamente. Es decir, además de la fragmentación de DNA determinada del 20% y 30% (daño primario), el 80% y 70% restante de los espermatozoides tendrían otro tipo de daño (daño secundario) que no miden los tests habituales de fragmentación de DNA y que, de no ser reparado, no es compatible con el desarrollo de un embarazo a término. Este concepto ha sido designado como el "efecto iceberg" (Evenson et al., 1999).

4. Activación de caspasas y endonucleasas espermáticas. La activación de caspasas y endonucleasas en espermatozoides diferenciados por factores físico-químicos puede inducir

también fragmentación del DNA espermático. Estudios previos indican que la exposición de espermatozoides de ratón *in vitro* a 40°C resulta en un aumento significativo en el grado de fragmentación del DNA (Sailer et al., 1997). Más recientemente, Banks et al., han demostrado la inducción de fragmentación de DNA en espermatozoides de ratón *in vivo* tras haber sido expuestos los testículos a una temperatura de 42°C (Banks et al., 2005). Dado que la fragmentación de DNA se encontró en espermatozoides aislados del epidídimo una hora después del estímulo, los autores concluyeron que el daño observado tendría que haberse producido en los espermatozoides a su paso por epidídimo y que podría ser causado por radicales libres o por activación de caspasas y endonucleasas espermáticas.

5. Fragmentación de DNA inducida por radio y quimioterapia Tests de fragmentación de DNA

Recientemente se han introducido una serie de tests para la determinación de daño de DNA en los espermatozoides. Estos tests incluyen TUNEL (*TdT-mediated-dUTP Nick-End Labelling*, Gorczyca et al., 1993), COMET (Hughes et al., 1996), CMA₃ (Manicardi et al., 1995), ISNT (*in-situ nick translation*, Tomlinson et al., 2001), DBD-FISH (*DNA Breakage Detection Fluorescence In Situ Hybridization* o detección de roturas en el DNA por hibridación *in situ*, Fernández et al., 1998, 2000), SCD (*Sperm Chromatin Dispersion Test*, Fernández et al., 2003) y el SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*, Evenson et al., 1980; 1983; 1985; 1991; 1994; 1999a; 1999b).

Un aspecto importante en la determinación la fragmentación de DNA es el relacionado con el tipo de roturas que se produce en las cadenas de DNA (cadena sencilla *versus* cadena doble) y la susceptibilidad a la fragmentación de DNA. Tests de fragmentación de DNA como el SCSA, SCD (Fernández et al., 2003), o COMET a pH ácido o alcalino (Singh et al., 1988; 1989) requieren un paso inicial de desnaturalización para detectar los fragmentos de DNA o roturas

potenciales en la cadena de DNA. De hecho, cuando se observa daño de DNA en condiciones de pH ácido o alcalino y no en condiciones de pH neutro se habla de puntos lábiles de rotura al tratamiento ácido o alcalino. Por el contrario, el test TUNEL (Gorczyca et al., 1993), ISNT (Gorczyca et al., 1993) y el COMET a pH neutro (Singh et al., 1988), no requieren un paso previo de desnaturalización y miden roturas auténticas de DNA de cadena sencilla (ISNT, TUNEL y COMET) y cadena doble (TUNEL y COMET). Dado que el pH intracelular en el ovocito es de 7.0, roturas de DNA de cadena sencilla o la presencia de puntos lábiles de rotura en el DNA no tendrían mayores consecuencias en la formación del pronúcleo masculino, ya que a pH neutro las cadenas de DNA no se disocian y, por lo tanto, este tipo de daño sería mucho más fácil de reparar. Por lo tanto, como una primera aproximación, podrían considerarse dos tipos de tests: (i) tests que miden "daño real" de DNA tales como TUNEL, ISNT o COMET a pH neutro, y (ii) tests que miden "daño potencial" de DNA o puntos lábiles de rotura al tratamiento ácido o alcalino y susceptibilidad a la desnaturalización de DNA, tales como el SCSA, SCD, Chromomycin A3 y COMET a pH ácido o alcalino (Singh et al., 1989). Tests que miden daño real de DNA deberían tener un mayor valor predictivo que tests que miden daño potencial de DNA. Esto está avalado por el estudio publicado por Greco et al., en el que se demuestra que la microinyección de espermatozoides eyaculados con valores de TUNEL >15% resultaron en una tasa de embarazo evolutivo por ciclo del 0% mientras que la microinyección de espermatozoides testiculares con valores <6% en un segundo ciclo de ICSI en estos mismos pacientes resultó en una tasa de embarazo por ciclo del 44.4% (Greco et al., 2005).

Es importante resaltar que si bien el test TUNEL con frecuencia se utiliza para determinar apoptosis en células, la positividad de TUNEL no es siempre sinónima de apoptosis, ya que el daño de DNA inducido por el radical hidroxilo y la radiación ionizante tam-

bién resulta en fragmentación de DNA de cadena doble que puede ser detectada por el test TUNEL (Negoescu et al., 1998).

El test que más se ha estudiado hasta ahora desde el punto de vista clínico es el test SCSA desarrollado por Evenson et al. (Evenson et al., 1980; 1983; 1985; 1991; 1994; 1999a; 1999b). El test SCSA mide la susceptibilidad del DNA de los espermatozoides a la desnaturalización *in situ* tras la exposición a un pH ácido. El DNA de espermatozoides con una cromatina normal no se desnaturaliza, mientras que si el DNA de los espermatozoides está dañado y contiene roturas en sus cadenas, se pueden alcanzar diferentes grados de desnaturalización. Para determinar el grado de desnaturalización del DNA espermático, tras el tratamiento ácido, se tiñen las células con naranja de acridina (AO). Dado que el AO es un fluorocromo metacromático, éste emite en verde cuando se intercala en cadenas de DNA dobles (DNA intacto), y en rojo si son de cadena sencilla (es decir, DNA fragmentado). El grado de daño de DNA, es decir la intensidad de la fluorescencia verde y/o roja en los espermatozoides se mide de forma cuantitativa por citometría de flujo y se expresa como DFI (*DNA Fragmentation Index*). Estudios previos indican que valores de DFI >27% están asociados con fallo de embarazo en TRA (Larson et al., 2000; Larson-Cook et al., 2003). Sin embargo estudios recientes ponen en tela de juicio el valor predictivo del test SCSA, ya que se han reportado casos de embarazo en técnicas de reproducción asistida con valores de DFI >27% (Gandini et al., 2004; Bungum et al., 2004).

Quizás en la mayoría de los casos el daño de cadena sencilla detectado en el DNA espermático por tests como el test SCSA no sea incompatible con una descondensación normal de la cromatina durante el proceso de fecundación del ovocito y la formación del pronúcleo masculino. En este sentido, el recién desarrollado test SCD nos puede ayudar a comprender mejor este proceso. El test SCD está basado en el hecho de que en espermatozoi-

des con las cadenas de DNA intactas se produce un desenrollamiento de los bucles de DNA, empaquetados en la matriz nuclear, tras haber sido expuestos a un tratamiento ácido seguido de un tratamiento con agentes reductores y detergentes. Esto desenrollamiento produce un halo alrededor de la matriz nuclear que se puede visualizar por microscopía de campo claro usando tinciones habituales como el Diff-Quik. Por el contrario, si una de las cadenas de DNA está dañada, no se produce el halo, observándose núcleos condensados. Sin embargo, si los espermatozoides no se exponen a este tratamiento ácido previo, se produce el desenrollamiento de los bucles de DNA, independientemente de que el DNA esté fragmentado o no. Dado que, como ya indicamos antes, el pH intracelular del ovocito es del orden de 7.0, un espermatozoide con DNA fragmentado que haya fertilizado el ovocito, podría desarrollar sus bucles de DNA permitiendo que se produzca la descondensación de la cromatina y la formación del pronúcleo masculino. Sin embargo, todavía cabría preguntarse ¿qué ocurre con ese pronúcleo masculino en el cual existen cadenas de DNA potencialmente dañadas? ¿va a afectar el desarrollo posterior del embrión? Obviamente, la respuesta a esta pregunta va a depender de varios factores entre los que cabe destacar el número de ovocitos obtenidos, la capacidad del ovocito de reparar este daño, si existe daño real o daño potencial y de si están afectados intrones o exones.

Dado que más del 90% del genoma humano está compuesto por intrones con secuencias repetitivas que no codifican por proteínas celulares, lo más probable es que de existir daño en las cadenas de DNA, éste no afecte a hot spots o secuencias que codifican proteínas (exones) que pudieran comprometer el desarrollo normal del embrión. Sobre este tema volveremos a hablar más adelante en la sección de preguntas y respuestas.

Dadas las limitaciones de tests como el SCSA y SCD, que miden susceptibilidad del DNA a la desnaturalización *in vitro*, en la predicción de tasas de fecundación y embarazo en técnicas de reproducción asistida, en la actualidad se recomienda el uso de tests como TUNEL o *in-situ nick translation* que miden "daño real" de DNA. La presencia de daño de cadena doble en el espermatozoide podría interferir de forma significativa con la descondensación de la cromatina espermática. Esto es consistente con los resultados de estudios que demuestran la existencia de bajas tasas de fecundación asociadas a niveles de fragmentación de DNA >10% medidos por el test TUNEL (Lopes et al., 1998; Benchaib et al., 2003). Sin embargo, como cabría esperar, el test SCSA no se correlaciona con las tasas de fecundación *in vitro* (Larson et al., 2000; Larson-Cook et al., 2003).

Aplicaciones al diagnóstico y tratamiento de la infertilidad ¿Cuáles son

las implicaciones del daño de DNA en el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad? La fecundación de ovocitos en metafase II por espermatozoides con daño de DNA podría conducir a alteraciones en el desarrollo del embrión, fallo en la implantación, o a un aumento en la tasa de aborto (Genesca et al., 1992; Parinaud, 1993; Twigg et al., 1998; Evenson, 1999b; Carrell et al., 2003). Ovocitos maduros con los mecanismos de reparación de DNA intactos tienen la capacidad de reparar un daño moderado de DNA en los espermatozoides (Brandiff and Pedersen, 1981; Matsuda and Tobari, 1988). Sin embargo, ovocitos inmaduros u ovocitos cuyos mecanismos de reparación no funcionen de forma adecuada (p.e., mujeres de edad avanzada) o que hayan sido dañados por factores tóxicos endógenos (p.e., radicales libres) o exógenos (p.e., radiación, tóxicos ambientales) no serían capaces de reparar este daño. Esto es consistente con la observación de que la inseminación de ovocitos de mujeres de edad avanzada -que previamente habían sido inseminados *in vitro* en varios ciclos con espermatozoides de baja calidad de su cónyuge y cuya transferencia resultó en fallo repetido de embarazo con espermatozoides de donante, frecuentemente resulta en un aumento significativo en la calidad embrionaria y en la tasa de embarazo (Genesca et al., 1992; Obasaju et al., 1999). Por consiguiente, los tests de fragmentación de DNA podrían potencialmente utilizarse en el diagnóstico de fallo

Tabla I. Valores del análisis de semen y fragmentación de DNA en muestras obtenidas en un período de tres meses y resultados clínicos obtenidos con tres de estas muestras.

ANÁLISIS DE SEMEN & FRAGMENTACIÓN DE DNA							
FECHA DE IAC/ICSI	FECHA MUESTRA	CONCENTRACIÓN*	% MOT	MORFOLOGÍA†	% DFI	TRA	EMBARAZO
18/4/01	10/12/00 [§]	56,0	45,0	8	18.5	ICSI	Gemelar
18/3/01	10/03/01¶	53,0	49,0	9	36.9	ICSI	NO
26/2/01	26/02/01¶	58,7	61,6	9	32.6	IAC	NO
-	14/01/01 [‡]	59,4	65,5	8	18.8	-	-
-	04/02/01 [‡]	55,6	59,1	7	30.6	-	-

*millones/ml

†% formas normales por criterios estrictos de Kruger (normal >4%) (Mortimer and Menkveld, 2001).

‡muestras recogidas entre ciclos de TRA. Alícuotas de 0,2 ml fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido para análisis por el test SCSA y alícuotas de 0,5 ml fueron criopreservadas en TEST-yolk buffer.

§muestra criopreservada el 10/12/00 y usada en el último ciclo de TRA el 18/4/01.

¶muestras recogidas el día del ciclo de TRA. Alícuotas de 0,2 ml fueron congeladas en nitrógeno líquido para análisis por el test SCSA

TRA: técnica de reproducción asistida

repetido de embarazo y abortos de repetición en TRA.

Sin embargo, no todas las muestras de semen que se obtengan de un paciente van a tener el mismo nivel de fragmentación de DNA. En un trabajo reciente, se ha encontrado que existe gran variabilidad en el grado de fragmentación de DNA en muestras de semen obtenidas de un mismo paciente en diferentes ciclos espermatogénicos (Álvarez et al., 2004). Los resultados que se muestran en la Tabla I corresponden a muestras de semen obtenidas de un mismo paciente en un período de tres meses. En esta pareja, alícuotas de las muestras de semen utilizadas en sus ciclos de reproducción asistida, fueron congeladas con TEST-yolk buffer/glicerol y alícuotas de 0,2 ml de estas mismas muestras, así como de otras tres muestras que se obtuvieron antes de empezar sus ciclos de reproducción asistida, fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido y enviadas a un laboratorio de referencia para el análisis de fragmentación de DNA por el test SCSA. Como muestran los resultados, de las cinco muestras que se analizaron, tres tuvieron valores de DFI >27% (las tres que resultaron en fallo de embarazo) y dos <27% (una de ellas resultó en un embarazo gemelar). Dado que en esta pareja no se produjo embarazo tras dos ciclos de TRA, se decidió utilizar una de las muestras que había sido previamente criopreservada con TEST-yolk buffer/glicerol y que tenía un valor de DFI por debajo de 27%. El uso de esta muestra en un ciclo posterior de ICSI resultó en un embarazo gemelar a término.

Si bien estos resultados son todavía muy preliminares y habría que confirmarlos en un mayor número de casos, sugieren que los tests de fragmentación de DNA espermático podrían utilizarse no sólo para el diagnóstico sino también para el tratamiento de la infertilidad. Es importante destacar que a pesar de que la fragmentación de DNA varió de forma significativa en los dos ciclos espermatogénicos estudiados, los parámetros estándar de semen no mostraron una variación significativa y estuvieron dentro de los

límites de la normalidad. Es decir, la causa de infertilidad de esta pareja pasaría de ser idiopática a ser de factor masculino.

Otro aspecto importante de las implicaciones clínicas del estudio de la integridad del DNA espermático está relacionado con el grado de fragmentación de DNA que se encuentra en espermatozoides testiculares vs. espermatozoides del epidídimo en oligospermias y azospermias obstructivas (Steele et al., 2003). En este estudio, Steele et al., demostraron que el grado de fragmentación de DNA en espermatozoides testiculares de pacientes con procesos obstructivos es significativamente inferior al de espermatozoides del epidídimo obtenidos de esos mismos pacientes. Estudios previos sugieren que factores tóxicos medioambientales, radicales libres producidos por espermatozoides inmaduros, o bien derivados de un varicocele testicular o producidos por el propio epidídimo (p.e., óxido nítrico producido por iNOS epididimaria), y/o la presencia de factores proinflamatorios, p.e., IL-6, IL-8) podrían resultar en la inducción de fragmentación de DNA. Por lo tanto, en lugar de obtener espermatozoides de los túbulos epididimarios en casos de procesos obstructivos, donde se pueden acumular estos factores y también se puede producir una obstrucción iatrogénica, se recomienda obtener espermatozoides testiculares, ya sea por la técnica de TESA o TESE.

Preguntas frecuentes sobre tests de fragmentación de DNA

1. ¿A qué pacientes se les debería hacer el test?

El análisis de fragmentación del DNA espermático estaría indicado solicitarlo en los siguientes casos:

1. Fallo repetido de FIV
2. Abortos de repetición (Carrell et al., 2003)
3. Edad del varón >40 años (Singh et al., 2003)
4. Varicocele (Smith et al., 2006)
5. Episodio de fiebre alta en los últimos tres meses (Evenson et al., 2000)
6. Cuando se va a congelar semen

antes de hacer una vasectomía

7. Cuando se va a congelar semen previo a tratamientos de quimio/radioterapia

2. ¿Si una muestra de semen de un paciente tiene un valor de fragmentación elevado, es ésta una condición permanente o pudiera ser que otras muestras tuviesen valores más bajos?

Si bien en donantes fértiles los valores de fragmentación suelen ser relativamente bajos y la variación en el grado de fragmentación de DNA en muestras de semen obtenidas en diferentes ciclos espermatogénicos es también baja (Evenson et al., 1991), en pacientes de infertilidad, el grado de fragmentación puede mostrar fluctuaciones significativas (Álvarez et al., 2004). Estas fluctuaciones pudieran estar relacionadas con alteraciones en el control de la espermiogénesis (p.e., varicocele, proceso inflamatorio subclínico, proceso febril) o con factores desencadenantes físico-químicos que induzcan apoptosis o activen endonucleasas espermáticas (p.e., proceso febril, tóxicos medioambientales) que podrían inducir fragmentación del DNA en los espermatozoides después de la espermiación (Evenson et al., 2000). Una vez que haya cesado el estímulo desencadenante, el grado de fragmentación de DNA se normalizaría en el ciclo espermatogénico siguiente. Por ello, en aquellos casos en los que la muestra de semen analizada tenga un valor por encima del umbral de normalidad del test utilizado, deberían recogerse varias muestras de semen, analizar el grado de fragmentación de DNA, criopreservarlas, y utilizar únicamente aquellas muestras con valores de fragmentación dentro de la normalidad. Esto sería particularmente útil en aquellos casos en los que las muestras de semen se vayan a congelar, p.e., pacientes que van a ser sometidos a quimio o radioterapia.

3. ¿Qué factores pueden causar fragmentación de DNA?

Una gran variedad de factores han sido asociados con la inducción de daño de DNA en los espermatozoides. Estos factores incluyen procesos inflamatorios agudos y crónicos, el estrés oxidativo, varicocele, fiebre alta, expo-

sición del testículo a temperaturas $>36^{\circ}\text{C}$ (Banks et al., 2005), tóxicos medioambientales, quimioterapia, radiación ionizante, edad >40 años, consumo excesivo de cafeína (= o $>$ tres tazas de café al día) (Schmid et al., Hum Reprod 2006, in press).

4. ¿Si el valor del test es normal, garantiza esto un alto nivel de fertilidad?

No necesariamente. La calidad del DNA pudiera ser óptima y sin embargo otros parámetros espermáticos u ovocitarios podrían estar también afectados. Como se ha indicado anteriormente, los tests de fragmentación pueden tener un alto valor predictivo negativo pero no positivo. Las tasas de fecundación e implantación, además de depender de la calidad genómica del espermatozoide que haya fecundado al ovocito, van a depender también de otros parámetros como son la calidad citoplasmática y genómica del ovocito y la receptividad del endometrio.

5. ¿Qué se hace cuando los valores de fragmentación de DNA obtenidos en varias muestras de semen son consistentemente altos? ¿tendría que recurrirse a semen de donante?

No. Muestras de semen con un valor de fragmentación por encima del umbral de normalidad pueden producir embarazos a término, independientemente de la edad de la mujer. Esto es particularmente cierto cuando se utilizan tests con un valor predictivo bajo. Estudios recientes muestran que muestras de semen con valores de fragmentación relativamente altos medidos por el test SCSA (Gandini et al., 2004; Bungum et al., 2004) o por el test SCD (Muriel et al., 2006) pueden resultar en embarazos viables a término. De ahí que se recomiende el uso de tests de fragmentación que miden daño real, como el test TUNEL, en combinación con tests que miden daño secundario de DNA como la presencia de 8-OH-2'-deoxiguanosina.

6. ¿Por qué muestras de semen con valores de fragmentación relativamente altos pueden dar lugar a un embarazo a término?

El valor predictivo de un test de fragmentación de DNA va a depender de varios factores. Estos factores incluyen:

1. Fragmentación de DNA de cadena sencilla vs. cadena doble. En general el daño de cadena sencilla es más fácil de reparar por ovocito que el de cadena doble.

2. Porcentaje de espermatozoides que están afectados. Cuanto más alto sea el porcentaje de espermatozoides con DNA fragmentado menor la probabilidad de que un espermatozoide con DNA intacto pueda fecundar al ovocito.

3. Grado de fragmentación de DNA por espermatozoide. Cuanto mayor sea el grado de fragmentación del DNA nuclear del espermatozoide, menor la probabilidad de que el ovocito lo pueda reparar.

4. Si existe únicamente daño primario o si existe daño combinado primario y secundario. Por ejemplo, en casos de apoptosis durante la espermatogénesis o roturas de DNA producidas durante la espermiogénesis, generalmente este tipo de daño no suele estar asociado a daño secundario. Por el contrario, en casos de daño post-testicular inducido por el radical hidroxilo o en casos de exposición a radiación ionizante, el daño primario (que suele ser de cadena doble) casi siempre está asociado a daño secundario.

5. Si el daño afecta intrones o exones. Más del 90% del DNA está formado por intrones. Por lo tanto, la probabilidad de que el daño de DNA afecte a exones, que son las secuencias del DNA que codifican proteínas, es relativamente baja.

6. Capacidad del ovocito de reparar daño de DNA en el espermatozoide que lo ha fecundado. Esta capacidad puede variar de un ovocito a otro en cohortes de ovocitos obtenidos en ciclos de in vitro. Desdichadamente, la capacidad de reparación del ovocito no se puede determinar in vitro, ya que esto afectaría su viabilidad.

7. Número de ovocitos. En ciclos de in vitro en parejas donde el nivel de fragmentación de DNA en semen, medido por TUNEL, es relativamente alto, la probabilidad de que se produzcan embriones viables y un embarazo a término va a depender, al menos en parte, del número de ovocitos obteni-

dos y de su capacidad de reparar daño de DNA en el espermatozoide. Si se dispone de seis ovocitos en metafase II (Fig. 1), la probabilidad de que se produzca un embarazo va a ser mayor que si se dispone de tan sólo tres ovocitos (Fig. 2). En este último caso, la probabilidad de que un espermatozoide con el DNA intacto fecunde un óvulo normal o de que un espermatozoide con DNA fragmentado fecunde un óvulo con una alta capacidad reparadora va a ser mucho menor que en el primer caso. Si bien en el primer caso, como se indica en la Fig. 1, podrían producirse dos embriones grado I, que podrían dar lugar a un embarazo, ello no quiere decir de que la fragmentación de DNA no esté asociada a un mal pronóstico en TRA, ya que de haber menos ovocitos como en el caso ilustrado en la Fig. 2, podría no producirse ningún embrión viable y, por lo tanto, no se produciría un embarazo. Por lo tanto, el número de ovocitos disponibles es un factor importante que va a influir en el valor predictivo de tests de fragmentación de DNA. Esto mismo se aplicaría a ciclos de coito dirigido e IAC, donde el número de ovocitos que se obtienen habitualmente es de uno y dos, respectivamente. Aquí las tasas de embarazo serían más bajas cuando el grado de fragmentación es relativamente alto, ya que habitualmente se desarrollan de uno a dos folículos. Por lo tanto, uno esperaría que el valor predictivo negativo de tests de fragmentación, especialmente aquellos que miden daño real como el test TUNEL, sea más alto en ciclos de IAC. Esto ha sido confirmado en un estudio donde se encontró una correlación significativa entre el grado de fragmentación de DNA en semen medido por el test TUNEL y las tasas de embarazo en ciclos de IAC (Duran et al., 2002).

Para concluir, podríamos decir que el valor predictivo de un test de fragmentación, I_{test} , es el sumatorio de varios factores: $I_{\text{test}} = I_{(1)} + I_{(2)} + I_{(3)} + \dots + I_{(n)}$. Algunos de estos factores pueden medirse y otros no como, por ejemplo, si el daño afecta a intrones o exones o la capacidad reparadora del ovocito.

FIGURA 1:

Resultado hipotético de un caso de ICSI donde seis ovocitos fueron microinyectados con espermatozoides provenientes de un semen con un nivel de fragmentación de DNA del 40% medido por TUNEL. La calidad de reparación de los ovocitos se indica mediante el símbolo +. Cuanto mayor sea la capacidad de reparación del ovocito mayor el número de símbolos + y viceversa. Cuanto mayor sea el grado de fragmentación de DNA en el espermatozoide mayor la intensidad de fluorescencia. De los seis embriones obtenidos, dos fueron de buena calidad (2 x G1) y cuatro de calidad deficiente (2 x G2, G4, G4). La transferencia de los dos embriones Grado I resultó en un embarazo. La calidad de los embriones se representa en día 3 por razones puramente didácticas ya que, en general, el efecto de la fecundación de ovocitos por espermatozoides con DNA fragmentado sobre la calidad embrionaria pudiera expresarse en estadios más tardíos (late paternal effects) (Tesarik et al., 2004).

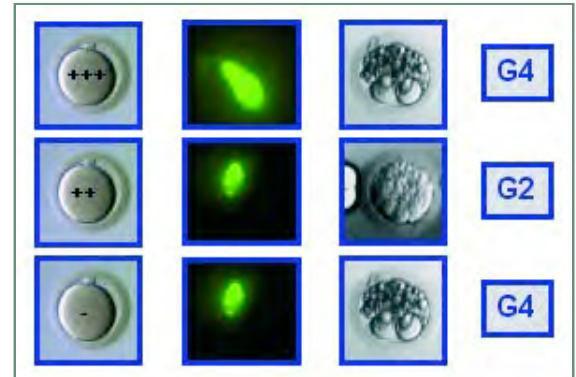
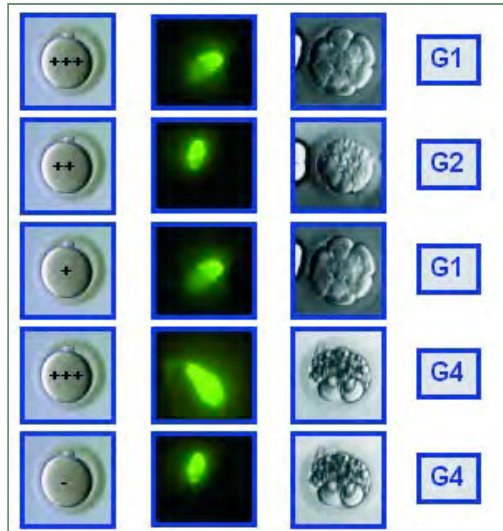


FIGURA 2:

Resultado hipotético de un caso de ICSI donde tres ovocitos fueron microinyectados con espermatozoides provenientes de un semen con un nivel de fragmentación de DNA también del 40% medido por TUNEL. Todos los embriones obtenidos fueron de mala calidad (G2, G4, G4). Se transfirieron los tres embriones y no se produjo embarazo.

7. ¿Qué test de fragmentación de DNA es el más recomendable?

Se recomienda utilizar tests que midan daño primario y daño secundario. Para determinar daño primario se recomienda el uso de tests de fragmentación que miden daño real como el test TUNEL, ya sea por microscopía o por citometría de flujo. Los kits comerciales que existen para el test TUNEL son sencillos, poco costosos, permiten el uso de microscopía de campo claro o de fluorescencia, dependiendo de si la sonda va conjugada a peroxidasa o fluoresceína, respectivamente (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y, por lo tanto, pueden realizarse en cualquier laboratorio. No se recomienda el uso de tests como el SCSA o el test SCD, incluyendo el Halosperm kit, ya que estos tests miden daño potencial o susceptibilidad a la desnaturalización del DNA y tienen un valor predictivo relativamente bajo en TRA. Para medir daño secundario se recomienda la determinación de 8-OH-2'-deoxiguanosina utilizando el kit de ELISA de Oxford Biomedical (Oxford Biomedical Research, USA).

Bibliografía

Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59:1037-46.

Álvarez JG, Ollero M, Larson-Cook KL,

Evenson DP. Selecting cryopreserved semen for assisted reproductive techniques based on the level of sperm nuclear DNA fragmentation resulted in pregnancy. *Fertil Steril* 2004; 81:712-3.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of mild scrotal heat on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129:505-14.

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18:1023-8.

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis hormone-regulated cell demise. *Hum. Reprod. Update* 1996; 2:103-117.

Brandiff B and Pedersen RA. Repair of the ultraviolet-irradiated male genome in fertilized mouse eggs. *Science* 1981; 211:1431-1433.

Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 2006; 2:1-10.

Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19:1401-8.

Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di Benedetto D, De Palma A, Romeo R, D'Agata R, Calogero AE. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004; 19:2298-302.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unex-

plained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* 2003; 49:49-55.

Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2003; 17:3122-8.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, and Melamed, MR. Relation of mammalian sperm heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210:1131-1133.

Evenson DP and Melamed MR. Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J. Histochem Cytochem* 1983; 31:248-53.

Evenson DP, Higgins PJ, Grueneberg D, Ballachey BE. Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry* 1985; 6:238-53.

Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Toxicol.* 1991; 5:115-25.

Evenson DP and Jost, LK. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: *Methods in cell biology*, Vol 42., Flow Cytometry (Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., and Crissman, H.A. (eds) Academic Press, Orlando, 1994; pp:159

Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999a; 11:1-15.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Clausen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999b; 14:1039-49.

Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a

- case study. *J Androl* 2000; 21:739-46.
- Fernández JL., Goyanes VJ., Ramiro-Díaz J., Gosalves J. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 82:251-56.
- Fernández JL, Vázquez-Gundin F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosalves J. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res* 2000; 453:77-82.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 59-66.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, Ciriminna R, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, Spano M. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004; 19:1409-17.
- Genesca A, Caballin MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum. Genet* 1992; 82:181-86.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 53:945-951.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, and Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2005; 20:226-30.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005; 26:349-53.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:613-19.
- Larson K., DeJonge C., Barnes A, Jost L, and Evenson DP. Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Hum Reprod* 2000; 15:1717-22.
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80:895-902.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13:896-900.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69:528-32.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52:864-67.
- McPherson SMG and Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod. Dev* 1992; 31:268-79.
- McPherson SMG and Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Devel Biol* 1993a; 158:122-30.
- McPherson SMG and Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993b; 37:109-128.
- Matsuda Y. and Tobarí I. Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light and methyl and ethyl methansulfonate. *Mutation Res* 1988; 198:131-44.
- Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions. *J Androl* 2001; 22:192-205.
- Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez JG, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 2006; 21:738-44.
- Obasaju M, Kadam A, Sultan K, Fateh M, Munne S. Sperm quality may adversely affect the chromosome constitution of embryos that result from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72:1113-25.
- Ollero M, Gil-Guzmán E, López MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Álvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod.* 2001; 16:1912-21.
- Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoille G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 1993; 60:888-892.
- Pentikainen V, Erkkila K, and Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am. J. Physiol.* 1999; 276:E310-E316.
- Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997; 18:294-301.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Revi Reprod* 1999; 4:31-37.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002; 66:1061-7.
- Schmid T, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek A. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*, [in press].
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Belau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005; 20:3446-51.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80:1420-30.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006; 21:986-93.
- Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SEM. A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999; 9:831-5.
- Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich M. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatine during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod* 2005; 20:3101-08.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004; 19:611-5.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001; 16:2160-5.
- Twigg, JP, Irvine, DS and Aitken, RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:1864-71.

OLYMPUS®

Your Vision, Our Future



**TENEMOS LAS PIEZAS
PARA SU NUEVO LABORATORIO.**

Olympus España le ofrece
una solución global para su
laboratorio de Reproducción Asistida.

Para más información, contactar con
Olympus España
902 444 204
informacion.micro@olympus-europa.com

INTRODUCCIÓN A DEBATE

La pregunta lanzada para este Debate es: “¿QUÉ ESPERAS DE ASEBIR?” Con ello se pretende conocer la opinión de los asociados e ideas para el mejor funcionamiento de nuestra sociedad.

Para el próximo número el tema propuesto es: “ La ética de los tratamientos de reproducción asistida “.

Os recordamos que esta sección de la revista está abierta a todos y que de todos depende que sea una herramienta actual e interesante. ¡Desde la vocalía de publicaciones os invitamos a participar!

¿QUÉ ESPERAS DE ASEBIR?

Ivan Solvas y Ma. Carme Pons. Unitat de Reproducció Assistida.
CENTRO MÉDICO TEKNON. Barcelona

Una de las tareas principales de ASEBIR debería ser la unificación de criterios en los diferentes campos de la Reproducción Asistida (por ejemplo: criterios de valoración y selección de embriones, número a transferir, técnicas de procesamiento de semen...). Una forma de hacerlo sería realizando cursos ASEBIR (similares a los realizados por otras asociaciones de ámbito europeo) para intentar buscar los estándares para las técnicas de reproducción, minimizando diferencias entre centros de reproducción asistida.

La Asociación podría promocionar reuniones periódicas monotemáticas y, a ser posible, prácticas con los especialistas de cada campo de la Reproducción Asistida. En ellas se

expondrían las últimas novedades (sobre técnicas, medios de cultivo, control de calidad...) y, a la vez, servirían para poner en común ideas, comentar problemas y casos atípicos.

Los aspectos más relevantes de estos talleres (similares a los Workshop europeos) podrían publicarse en la propia revista de ASEBIR para hacer extensivo su conocimiento al resto de profesionales.

Siguiendo el modelo estadounidense, sería recomendable el establecimiento de convenios con Universidades y/o centros de otros países que permitiesen a los asociados hacer estancias con el fin de aprender nuevas técnicas o de perfeccionarlas. La experiencia generada en estos

intercambios repercutiría muy positivamente tanto en el embriólogo como en el laboratorio en el cual trabaja.

Otro punto fuerte de la Asociación debería ser la asesoría jurídica de sus asociados sobre los aspectos legales en la aplicación diaria de las técnicas.

Finalmente ASEBIR, en representación de los embriólogos, debería, por un lado, erigirse como un interlocutor válido (junto a los colegios profesionales) para defender los intereses del colectivo ante la Administración y, por otro lado, ser el medio encargado de divulgar a la sociedad (prensa, escuelas y otros colectivos) la actividad propia de nuestra profesión.

¿QUÉ ESPERAS DE ASEBIR?

Fernando Marina CEFER. Barcelona

Soy el socio de ASEBIR número 17. Me incorporé a esta sociedad en sus inicios, cuando era estudiante de Biología. Por tradición familiar ya tenía pensado trabajar en reproducción humana y cuando el Dr. Santaló nos habló de esta sociedad, en una clase de Biología Celular de 5º curso

de carrera, sentí la necesidad de inscribirme. Me pareció genial que existieran Sociedades tan específicas de la temática que en aquellos momentos y aún en la actualidad me apasiona tanto. Me congratulé la circunstancia de que hubiera tanta información, tanta gente implicada y tantos proyec-

tos que justificaran la creación de esta sociedad. En la actualidad, tengo el honor de participar en la Junta Directiva y las ganas de aportar cosas nuevas. Mi incorporación a la Junta Directiva ha tenido un inicio un poco extraño. Digo extraño porque junto con la alegría de poder participar de

forma activa en esta sociedad he compartido con el resto de miembros de la Junta el sentimiento de desasosiego derivado de la poca asistencia y participación que hubo en la última Junta General de Zaragoza. Después del desánimo inicial, afortunadamente, y gracias al espíritu positivo y emprendedor de los miembros de la Junta, rápidamente hubo un sentimiento de poner remedio a este hecho. Las primeras propuestas se encaminaron a intentar encontrar un horario más atractivo para celebrar la Junta General. Posteriormente, y después de un análisis más reposado, se pensó en llevar a la revista éste hecho en forma de debate. Para evitar que la baja asistencia a la Junta General viniera motivada por un alejamiento entre las necesidades del asociado y las actividades de la Asociación, se decidió proponer éste tema. Esta es una forma de permitir que el socio opine y dé ideas a la Junta para conseguir que todos nos impliquemos en mayor medida en los objetivos de la Sociedad. Dado que las aportaciones y las opiniones de los socios son fundamentales para la salud de ASEBIR, se ha querido abrir este debate para permitir que todos los que no asisten a las Juntas Generales puedan aportar ese pequeño pero tremendamente útil granito de arena.

Después de esta inicial disposición de motivos quisiera entrar a considerar qué es lo que yo, y supongo que muchos socios, esperamos de ASEBIR. Antes de empezar a pedirle cosas a ASEBIR, tenemos que tener claro cuáles son los fines de la asociación. Cuando pregunto a mis colegas biólogos qué esperan ellos de ASEBIR me contestan de forma general “que defienda a los biólogos ante el estado”. Sin embargo, ésta función corresponde a los Colegios Oficiales y, además, ASEBIR no solo está compuesta por biólogos. Sin embargo, sí podemos pedirle a ASEBIR que sirva de interlocutor con los Colegios y con el estado o el ministerio de sanidad para defender los intereses particulares de las personas que trabajamos en reproducción. Por tanto, antes de pedirle nada a ASEBIR, tenemos que tener claro cuáles son sus fines. Para saber esto, lo tenemos tan fácil como acudir a

nuestros estatutos, y concretamente al artículo 4:

ARTÍCULO 4.- Fines de la asociación

a) Agrupar en España a los Licenciados o Doctores que trabajan en el ámbito de la Biología de Reproducción, es decir, en el desarrollo y aplicación de técnicas de reproducción y de caracterización genética, incluyendo tanto a los profesionales que se dedican a tareas de aplicación clínica humana, como a los procedentes de áreas de investigación básica en especialidades afines.

b) Fomentar el estudio, desarrollo y difusión de las distintas especialidades que comprende la Biología de la Reproducción, poniendo en común los conocimientos y líneas de investigación de cada equipo y redactando aquellos protocolos que se puedan estandarizar.

c) Establecer programas de aprendizaje de las técnicas y de formación, así como determinar criterios de acreditación de los centros y de los profesionales promoviendo el acceso a cuantos títulos de especialistas abarque en su día el Laboratorio de Biología de la Reproducción.

d) Establecer intercambios y promover estudios multicéntricos y multidisciplinarios, fomentando de este modo la relación y colaboración entre sus miembros.

e) Mantener colaboración con las otras asociaciones científicas y profesionales tanto nacionales como extranjeras de especialidades afines, así como con organismos universitarios y autoridades sanitarias y educativas de todos los niveles de la Administración.”

El punto 4a habla de “agrupar”. Este objetivo o fin de la asociación está a mi modo de ver claramente conseguido. La sociedad dispone de un listado de socios, al cual, se puede acceder desde la web. Además, se preocupa de que éste grupo de personas tenga la posibilidad de reunirse en un Congreso. ¿Podemos pedirle más a ASEBIR sobre este punto?. Pues a lo mejor sí. Desde esta revista podemos

pedir a ASEBIR que haga una política activa para que los socios participen más en la web para relacionarse con colegas de la sociedad. Por la parte que me toca como miembro de la Junta os animo a participar en el Foro de la web, a mantener actualizados los datos del listado de socios, a utilizar la web para solicitar ofertas de trabajo, a consultar la agenda de congresos (es una de las más completas)... Es posible que muchos estéis pensando en estos momentos lo siguiente “no me acuerdo del password”. Quizás deberíamos pedirle a ASEBIR que permita cambiar con facilidad el usuario y password para que la gente use uno que conozca y le sea familiar.

La revista, el congreso, la web y la publicación del primer cuaderno de embriología clínica tienen el fin de cumplir con los objetivos de los puntos 4b y 4c. Pero, queda mucho por hacer. En cuanto a la redacción de protocolos que se puedan estandarizar, ASEBIR está poniendo la semilla. El cuaderno sobre recursos humanos y físicos para el laboratorio de reproducción asistida humana es la culminación de un gran esfuerzo realizado por un equipo coordinado por José Antonio Castilla. Pero no es sólo eso, lleva delante un número, el primero, lo cual indica que vendrán más detrás. Está previsto que los próximos cuadernos traten sobre la catalogación de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos y sobre el registro de datos del laboratorio de reproducción asistida. Tenemos, pues, que pedirle a ASEBIR que continúe con esta línea iniciada. Pero también aprovecho para solicitar a los socios que estas guías las tomemos y las utilicemos como referencia válida en foros nacionales e internacionales.

El punto 4c habla de establecer programas de aprendizaje de las técnicas y establecer programas de formación. ASEBIR, en esta línea, ha publicado el programa de formación de embriólogo clínico al que podéis acceder desde la web. Estos fines formativos pueden ser conseguidos de forma activa, organizando “workshops” o de forma pasiva, auspiciando actividades propuestas por otros centros o sociedades. No sería descabellado solicitar a ASEBIR que activamente, además



K

NF Workstation L04



del congreso, organizara talleres prácticos que fueran más accesibles a los socios que algunos excesivamente caros y extensos Masters en Reproducción Humana que existen en la actualidad. Para este propósito, le podríamos pedir a ASEBIR que actué como coordinador entre posibles centros organizadores, casas comerciales que quieran mostrar cómo utilizar sus productos y comités científicos que decidan qué técnicas, cómo y cuándo organizar estos eventos.

Promover estudios multicéntricos como apunta el punto 4d es una tarea difícil que no es útil si no está bien diseñada. Pero, valdría la pena insistir en este punto y establecer políticas activas para proponer y ejecutar alguno de estos estudios. Iniciativas como la del grupo CEIFER en el tema de control de calidad favorecen que se pongan en común datos multicéntricos. Sin embargo, podríamos pedir a ASEBIR que encabezara activamente más iniciativas como las del grupo de interés en diagnóstico genético preimplantacional, que recoja y presente e informe (web, revista o congreso) sobre los resultados multicéntricos obtenidos.

Finalmente, en cuanto al punto 4e me gustaría comentar el gran esfuerzo realizado por ASEBIR en busca del reconocimiento de nuestra especialidad ante los usuarios de las técnicas y ante la propia administración. El Colegio Oficial de Biólogos junto con ASEBIR ha desarrollado el Reglamento para la Calificación de Especialista en Reproducción Humana Asistida. Otra actividad importante de ASEBIR se ha realizado como miembro de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida del Ministerio de Sanidad y Consumo. ASEBIR también ha fomentado la unión con otras sociedades científicas españolas con la creación de la Federación de Asociaciones para el Estudio de la Reproducción (SEF, ASES, SEC y ASEBIR). En este punto lo único que creo que le podemos pedir a ASEBIR es que nos informe más eficazmente de todas estas actividades. Para ello sería útil la creación de un boletín electrónico que con una periodicidad, por ejemplo, trimestral informara de las actividades que se realizaran en este sentido. Este boletín podría ser útil también para potenciar los demás puntos puesto

que podría informar de actividades formativas, bolsa de trabajo, novedades en la web, etc. Creo que la información anual que se da en la Junta General o la semestral que aporta la revista puede llegar a ser escasa para muchos socios

Por último, considero que ASEBIR esta realizando una importante labor con ayuda del tremendo esfuerzo altruista y el gran empeño e ilusión que ponen los miembros de la Junta Directiva. Sin embargo, una sociedad no puede funcionar si sus asociados no la apoyan. Ruego por tanto, que aunque a veces supone un gran esfuerzo acudir a las Juntas Generales, cada miembro sea capaz de realizar este pequeño sacrificio anual y contribuya con su presencia y aportación a que ésta sea una sociedad viva, con buena salud y con ganas de conseguir nuevos logros.

¿QUÉ ESPERAS DE ASEBIR?

Antonio Urries. Reproducción Asistida Quirón Zaragoza

Resulta difícil decir que espero de ASEBIR sin que parezca una crítica hacia lo que es actualmente nuestra asociación. Todo lo contrario. Si me preguntaran si estoy contento de lo que es, de lo que aporta, diría que sí. Desde su creación en 1993 la hemos visto crecer, y por mi parte siempre es una satisfacción cualquier cosa que provenga de ella.

Pero dicho esto, si el debate es sobre "lo que esperas", se supone que hay que reflejar aquello que actualmente podríamos considerar pueda enriquecerla.

Podríamos mencionar algunos aspectos más o menos importantes, como mejorar la página web, abrir un grupo de noticias dinámico que nos

permita recibir información sobre novedades, congresos, bolsa de trabajo, etc., pero me voy a centrar en algo más esencial (por lo menos para mí).

Repasando los objetivos primordiales que aparecen en la presentación de la página Web (www.asebir.com) podemos leer:

-Fomentar el estudio, desarrollo y difusión de las especialidades, conocimientos y líneas de investigación...

-Establecer programas de aprendizaje de las técnicas, así como determinar criterios de acreditación de los centros...

-Establecer intercambios y promover estudios multicéntricos...

-Mantener colaboración con otras asociaciones...

Y realmente, en todos y cada uno de

esos puntos se ha ido avanzando, aunque aún queda mucho por recorrer e incluso, en algunas cosas, por empezar a andar.

En primer lugar ¿Por qué no empezamos reforzándonos nosotros mismos? Considero que quizá lo que deberíamos hacer es determinar criterios de acreditación de los laboratorios, no de los centros y luchar porque reconozcan nuestra identidad. ¿Por qué no generar incluso nuestros propios "Protocolos de consentimiento informado" para los pacientes? ¿Y cómo es posible que hoy en día aún se dude que podamos ser los jefes-responsables-directores de nuestros laboratorios en el ámbito legal?.

Actualmente, y todos lo estamos

viendo, un Laboratorio de Reproducción Asistida es algo más que un sitio donde capacitar semen y generar embriones para transferir a una mujer, y sólo estamos empezando. Obviamente, en cualquier campo de la ciencia es imprescindible la colaboración con muchas otras disciplinas médicas y/o científicas, pero colaborar no es supeditar ni limitar, y, tal como vimos en nuestro último congreso, las puertas que se están abriendo podemos elegir el traspasarlas o no, pero desde luego no podemos negarlas, y no creo que nadie piense que el que personas muy representativas de nuestra especialidad ocupen cargos importantes dentro de la Medicina Regenerativa sea una casualidad.

En el momento que asumiéramos esto, y asumiéramos nuestra identidad, el resto de mis "esperanzas" ven-

drían por sí solas. Porque ¿quién puede emitir una opinión más calificada sobre si se puede (o no) congelar ovocitos?, ¿Quién puede razonar con mejor criterio el significado que puede tener el término "fecundar tres óvulos"?, por mencionar dos debates con que nos hemos encontrado recientemente. Me consta que nuestra asociación se ha movido y ha unido sus esfuerzos a otras asociaciones para emitir conclusiones y comunicados, pero yo por lo menos he echado algo en falta, algo que sigue teniendo que ver con nuestra identidad. ¿Dónde está nuestra "opinión" como asociación? ¿Dijimos algo cuando amenazaron con cerrar un laboratorio en Barcelona por congelar óvulos? ¿A quien sancionaban? ¿Al centro? ¿Al laboratorio? ¿A la persona que realizaba la técnica? (Que, por cierto, pertenecía a ASEBIR). Y aquí es donde yo introduciría otro objetivo primordial:

-Emitir opiniones sobre aspectos científicos, profesionales y legales que puedan afectar a nuestra especialidad. Haciendo extensible su divulgación al público en general mediante los medios adecuados cuando se considere conveniente.

Luego unimos esfuerzos con quien haga falta, pero nuestra opinión por delante.

E incluso:

- Defender los intereses profesionales de los asociados.

Y sobre todo, como colofón:

- Determinar criterios de acreditación de los laboratorios y de las personas responsables de ellos adecuándolos a la realidad.

Aunque, naturalmente, es sólo una opinión.

¿QUÉ ESPERAS DE ASEBIR?

M^a Victoria Hurtado de Mendoza¹, Mark Grossmann² y Nieves Cremades³.

Junta Directiva. Vocalía de Publicaciones

¹CEHISPR. Sevilla. ²CENTRO MÉDICO TEKNON. Barcelona ³Hospital General Universitario de Alicante. Alicante

Una de las razones de pertenecer a una Sociedad, Asociación o Colegio profesional es sentirte cerca de tus colegas para poder compartir intereses, comentar dudas, aprender, estar al día, que tus derechos sean defendidos y sentirte respaldado. Quizás por todo ello nació ASEBIR, seguro que sus fundadores no sabían que iba a crecer tanto y a tener su propio peso específico en la sociedad científica. Hoy por hoy se han conseguido muchas cosas y seguro que aún podemos conseguir más.

¿Qué esperas de ASEBIR? En parte ya está contestado, pertenecer a una sociedad dinámica, que nos permita estar al día, información actualizada sobre congresos, cursos, jornadas, conexión con nuestros colegas mediante la página web, la revista, realización de cursos y jornadas realizados por miembros de y para ASEBIR. Asimismo, la creación de una

bolsa de trabajo y una asesoría legal serían muy útiles. Si bien es cierto que ASEBIR no es un Colegio Profesional.

Actualmente, tenemos el honor de pertenecer a la Junta Directiva y trabajar en la Vocalía de Publicaciones, la Revista, lo cual es un privilegio. Y es desde esta perspectiva que les pediríamos a los socios de ASEBIR una mayor colaboración con la Revista ya que la calidad de los trabajos publicados, la participación en Debate y la puesta al día en Formación Continuada hacen de nuestra revista un escaparate de la salud de nuestra asociación. Así como con la página web que debería ser visitada con mayor asiduidad, y sea dicho de paso, existe un Foro en el que hay muy poca participación.

Hemos recibido una asociación que ya ha cumplido sus 10 años y sería

deseable que personas entusiastas y comprometidas siguieran portando el testigo. Por ello, es casi incomprensible la falta de asistencia en la última Asamblea general. Se han hecho importantes logros y se está trabajando para conseguir buenas oportunidades para todos. Es bastante frustrante que los asociados no muestren interés. Si el fallo fue de la hora y lo apretado de la Jornada, sería muy útil que se hiciese constar para que en próximas Asambleas este hecho se tenga en cuenta.

En resumen, esperamos que ASEBIR siga adelante luchando porque se conozca y reconozca nuestro trabajo como embriólogos clínicos y que todos colaboremos por una asociación sana y dinámica.

TODO LO QUE NECESITA DESDE LA PUNCIÓN....

Agujas



Una gran variedad de agujas de alta calidad especialmente diseñadas para la aspiración de ovocitos. Sólomente UNA razón: Optimizar su posibilidad de éxito.

Bomba de aspiración



Pipetas



Medios de cultivo



Mini-incubador



...HASTA LA TRANSFERENCIA

La variedad perfecta de catéteres de transferencia para finalizar el "Arte del Cultivo de Embriones" con el éxito de un BEBÉ.

Para más información contacte con su representante de COOK Women's Health o con nuestro Servicio de Atención al Cliente: 91 270 26 71.

COOK[®]
Women's Health

www.cookmedical.com

Catéteres



*In memoriam:**A Esther*

Generalmente uno escribe en las secciones de obituarios sobre el fallecimiento de sus maestros o jefes, pero hoy me toca hablar de la muerte de una compañera: Esther González Lobo. Fallecida el 20 de septiembre de 2005 a los 30 años, dejando el recuerdo de una mujer que quiso por encima de todo ser feliz. Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, Embrióloga Becaria de la Fundación Virgen de las Nieves de Granada y Miembro del comité científico del II Congreso de ASEBIR.

Muchos socios de ASEBIR la recordaran por su participación en este Congreso, pero quizá no sepan que su esfuerzo y trabajo fue un elemento clave en su organización., y que gran parte de las felicitaciones que recibimos por su organización eran para ella. Nunca imaginé la tristeza que queda cuando se pierde a una persona a la cual has enseñado tus vicios y virtudes en el laboratorio de reproducción, que has regañado y felicitado por las malas y buenas rachas de "G" (gestaciones), con la que has firmado artículos, libros y comunicaciones, con la que has hecho planes laborales, que has visto saltar de alegría por sus primeros embarazos, y por su primer oferta de trabajo como embrióloga.

Nunca imaginé que aquella recién licenciada que hace ahora 5 años vino a solicitar ser becaria de la Unidad de Reproducción, iba con el tiempo a ser una gran amiga y compañera, que con su sinceridad y espontaneidad expresaba su opinión en las sesiones clínicas, muchas veces discrepantes de la mía. Hoy me gustaría hablar de sus logros profesionales, pero lamentablemente el destino no le dio tiempo para alcanzarlos, pero si nos permitió vislumbrar que hubiera llegado donde hubiera querido y que el único límite a su carrera profesional sería el que ella se hubiera marcado. Ejemplo de ello fue su participación como docente en el curso de reproducción de nuestra Unidad durante todo el tiempo que duró su enfermedad, a pesar de los duros y agotadores tratamientos que recibió.

Creo que ASEBIR se va haciendo mayor. Nosotros que estamos acostumbrados a trabajar con la vida en sus primeras etapas, debemos también ir aprendiendo a lidiar con los últimos coletazos de ésta. Gracias por estos 5 maravillosos años.

José Antonio Castilla

CAMBIOS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN RELACIÓN CON LA SUBFERTILIDAD DEL VARÓN

Function of androgen receptor, immunoexpression in normal and infertile men.

Elia Dina Galo¹, Pilar González-Peramato², Roald Gómez-Pérez³, Manuel Nistal⁴, Javier Regadera⁵

¹Departamento de Morfología Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. ²Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Guadalajara. Universidad de Alcalá. ³Unidad de Endocrinología, Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela. ⁴Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Paz. Madrid. ⁵Departamento de Anatomía Histología y Neurociencia de Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN: La producción de testosterona en los humanos se inicia alrededor de las semanas 8a y 9a de gestación. Este es un evento crucial para el desarrollo sexual primario en un embrión 46,XY (masculinización), y para el normal desarrollo sexual secundario en la pubertad (virilización). La testosterona además es esencial para mantener los caracteres sexuales secundarios en la vida adulta y para iniciar y preservar la espermatogénesis. Las acciones de los andrógenos se cumplen por medio del receptor de andrógenos (RA). La unión de los andrógenos a su receptor induce un cambio estructural en el RA, convirtiéndolo de un estado inactivo a su forma activa. En el testículo humano la immunoexpresión del RA se ha detectado exclusivamente en el núcleo de células de Sertoli, en las células de Leydig y en las células mioideas peritubulares. La función de estas células está estrechamente relacionada a la concentración y expresión del RA. Mutaciones en el RA ocasionan alteraciones en la acción de los andrógenos, afectando la función endocrina a nivel testicular y de otros órganos diana, comprometiendo además la función reproductiva. El significado de la expresión del RA en la patología testicular funcional congénita y adquirida del testículo humano no está aún bien establecido. En la presente revisión se evalúan los diferentes patrones de expresión inmunohistoquímica del RA reportados en el testículo de hombres normales y en pacientes con patología testicular, y se valora el significado funcional de las alteraciones histológicas y moleculares del RA en relación con la disfunción de la fertilidad en estos pacientes.

PALABRAS CLAVE: Receptor de andrógenos. Testículo, Infertilidad.

ABSTRACT: Testosterone production begins at weeks 8 to 9 of gestation in the human. It is a critical event for primary male sexual development in a 46,XY embryo (masculinization), and for normal secondary sexual development at puberty (virilization). Testosterone also is essential to maintain the secondary sexual characters during adulthood, and for the initiation and preservation of spermatogenesis. The androgen actions are mediated by the androgen receptor (AR). Upon binding of androgens to its receptor, the AR undergoes a conformational change that converts it from an inactive state to its active DNA-binding state. In the human testis, the AR immunoexpression has been detected exclusively in the Sertoli cells nuclei, in the Leydig cells, and in the peritubular myoid cells. These cells function have a strong relation with the AR concentration and expression. Mutations of the AR results in alteration of androgens actions, affecting the endocrine function at the testicular level and in other target organs, affecting also the reproductive function. The meaningful of the AR expression in the congenital and acquired functional testicular pathology, has not been established yet. In this review different immunohistochemical expression patterns of the AR, reported in the testis from normal men, and from patients with testicular pathology are evaluated; also the functional significance from the histological and molecular alterations of the AR are evaluated, in relation with the fertility dysfunction of these patients.

KEY WORDS: Androgen receptor, Testis, Infertility.

INTRODUCCIÓN

Los andrógenos son hormonas esteroideas importantes para el desarrollo fenotípico masculino; tienen un papel muy importante durante la diferenciación masculina, el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios. Los andrógenos son imprescindibles para la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis. Las acciones de los andrógenos están mediadas por el receptor de

andrógenos (RA) (Brinkmann, 2001). En el testículo humano, la immunoexpresión del RA se observa en las células de Sertoli, células mioideas peritubulares, células de Leydig, y células periarteriolares; pero no existe inmunomarcaje para el RA en los diferentes tipos de células germinales (Van Rooijen et al., 1995; Suárez-Quian et al., 1999). El RA de los núcleos de las células de Sertoli participa activamente en los mecanismos de regulación paracrina entre la espermatogénesis y

la esteroidogénesis (Vornberg et al., 1994; van Rooijen et al., 1995; Zhou et al., 1996).

Recientemente, el estudio del RA ha adquirido singular importancia, sobretodo en pacientes con cáncer de próstata, ya que se han detectado algunas mutaciones en una proporción pequeña de estos pacientes (Newmark et al., 1992; Gaddipati et al., 1994). Sin embargo, niveles de immunoexpresión de proteínas del RA

son similares en tumores prostáticos dependientes de andrógenos (Bonaccorsi et al., 2003; Denmeade et al., 2003), además, algunos genes que regulan el RA se expresan anómalamente en el cáncer de próstata (Denmeade et al., 2003), lo que sugiere que el RA puede participar en el crecimiento del cáncer de próstata en la ausencia de andrógenos testiculares (Gaddipati et al., 1994; Bonaccorsi et al., 2003; Denmeade et al., 2003).

Mutaciones del RA también se han asociado con defectos en la virilización. En este sentido, diferentes tipos de mutaciones se han detectado en el gen del RA en individuos con síndrome de insensibilidad a los andrógenos (Brinkmann, 2001; Quingley 1995) (*Androgen Insensitivity Síndrome, AIS*). Sin embargo, el significado de la expresión del RA en la patología testicular funcional congénita y adquirida del testículo humano no está aún bien establecido.

En la presente revisión se evalúan los diferentes patrones de expresión inmunohistoquímica del RA reportados en el testículo de hombres normales y en pacientes con patología testicular, y se valora el significado funcional de las alteraciones histológicas y moleculares del RA en relación con la disfunción de la fertilidad en estos pacientes.

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL RA

El RA pertenece a una subfamilia de la gran familia de factores de transcripción nuclear que incluyen el receptor de estrógenos (RE alfa y RE beta), el receptor de hormonas tiroideas (RT), el receptor de la vitamina D y el receptor del ácido retinoico (Quingley 1995). La unión de los andrógenos a su receptor induce un cambio estructural en el RA que convierte al receptor de un estado inactivo a su forma activa, favoreciendo su unión al ADN (Grino, Griffin & Wilson, 1987). Por analogía con otras hormonas esteroideas, la unión de la hormona al receptor -ésto es de los andrógenos al RA- ocasiona cambios de varias proteínas asociadas al receptor, como la proteína de shock térmico de 90 Kda (Housley et al., 1990). Hay evi-

dencia que la unión de los andrógenos a su receptor es importante para mantener los niveles del RA, ya que esta unión produce una estabilización protectora del receptor que impide su degradación (Kempainen et al., 1992).

El gen para la síntesis del RA fue secuenciado en el brazo largo del cromosoma X (Xq 11-12) (Brown et al., 1989). El sexo masculino solo tiene una copia del gen, el cual está constituido por 8 exones y codifica a una proteína con una longitud de 910 a 919 aminoácidos (Lubahn et al., 1989). El exon 1 es el más largo (1.613 pares de bases) y codifica la porción amino terminal de la proteína. La función de esta porción del receptor es iniciar la transcripción génica. Los exones 2 y 3 codifican el dominio de unión al ADN, estructuralmente constituyen los dos dedos de zinc. Las mutaciones en esta región condicionan un RA no funcional, debido a su incapacidad para la unión al ADN y por ende el no inicio de la actividad de transcripción génica. Los exones del 5 al 8 codifican la porción del receptor requerida para la unión de los andrógenos al receptor, en este dominio es donde se han detectado el mayor número de mutaciones en el RA (Quigley et al., 1995). Las mutaciones en esta región pueden alterar la afinidad para la unión de los andrógenos y/o la especificidad de unión (Wiener et al., 1997). Aproximadamente el 20 % de todas las mutaciones del gen del RA ocurren en los codones con residuos de arginina (Quigley et al., 1995).

Junto al extremo 5' del exon 1, en el dominio amino terminal, se encuentra una región repetida de la tripleta CAG, variable en extensión, con un promedio de 9-38 repeticiones en la población normal. Esta región repetida dentro del gen constituye un polimorfismo, dado que existe variabilidad alélica. Se ha observado que la expansión de la tripleta CAG (repeticiones) está asociada con una leve modulación de la actividad del receptor androgénico. En la atrofia muscular espino bulbar (enfermedad de Kennedy) la repetición de la tripleta CAG se ha encontrado expandida en la mayoría de los

pacientes y varía entre 38 y 75 unidades de repetición (Nance, 1997).

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RA

En el tracto reproductivo masculino, la inmunolocalización del RA ha sido observada constantemente en el núcleo de las siguientes células: 1) en el testículo: células de Sertoli, células de Leydig, células mioideas peritubulares, epitelio de la rete testis y epitelio de los conductos rectos; 2) en el epidídimo: células ciliadas y principales de los conductos eferentes, en las células principales, basales y apicales del conducto epididimario; 3) en el conducto deferente: células oscuras y apicales estrechas; 4) en la próstata y vesículas germinales: células basales (de reserva) y principales (secretoras). El RA se ha observado también en todas las células musculares lisas, células endoteliales, y fibroblastos presentes en el testículo y en la vía espermática. El RA se expresa, aunque en grado variable, en una amplia variedad de tejidos, incluyendo glándulas sudoríparas, folículos pilosos, músculo cardíaco, células musculares lisas gastrointestinales, células foliculares de la tiroides, y células de la corteza adrenal (van Rooijen et al., 1995; Suárez-Quina et al., 1999; Quingley et al., 1995; Sar et al., 1990; Regadera et al., 2001; Janssen et al., 1994). Solo se han inmunolocalizado vestigios del RA en el núcleo de las células del músculo liso vasculares (van Rooijen et al., 1995; Iwamura et al., 1994; Skinner, 1991). La inmunocoloración del RA citoplasmática no se ha observado en estructuras testiculares humanas (Regadera et al., 2001).

EXPRESIÓN DEL RA EN EL TESTÍCULO NORMAL HUMANO

La intensidad de la inmunocoloración del RA es más fuerte en el núcleo de las células de Sertoli que en el núcleo de las células peritubulares, aunque en estas últimas la inmunotinción positiva parece ser más constante que en la célula de Sertoli (Regadera et al., 2001). En un estudio preliminar usando pequeñas biopsias testiculares humanas, no se observaron cambios en la inmunoe-

presión del RA de las células de Sertoli en relación con los diferentes estadios de la maduración de la espermatogénesis (van Roijen et al., 1995). Sin embargo, recientemente en un estudio mucho más amplio empleando piezas completas de testículo humano, obtenidas quirúrgicamente en pacientes con cáncer de próstata, o durante la autopsia, se han demostrado cambios en la intensidad de la inmunocoloración del RA de células de Sertoli humanas. Estos hallazgos sugieren que la función del epitelio seminífero muy probablemente se relacione directamente con la intensidad de la tinción nuclear del RA. Además, existen ciertas evidencias acerca de que la secreción de determinadas proteínas de la célula de Sertoli humana que controlan la función del ciclo del epitelio seminífero están reguladas por el RA (Suárez-Quian et al., 1999). Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis que sugiere que la regulación de andrógenos en la espermatogénesis ocurre exclusivamente a través de las células de Sertoli -células somáticas testiculares-, ya que no se ha demostrado inmunohistoquímicamente la expresión de RA en las células germinales (Suárez-Quian et al., 1999).

Las células mioideas peritubulares participan, en parte, en la regulación androgénica de la espermatogénesis a través de un mecanismo paracrino (Skinner, 1991), mediante la estimulación del RA, constantemente presente en el núcleo de las células mioideas. Paradójicamente, las células de Leydig de testículos humanos exhiben una inmunolocalización de RA de intensidad tenue, y asimismo, un número apreciable de estas células intersticiales parecen ser negativas para RA (Regadera et al., 2001).

ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN DEL RA EN PATOLOGÍA TESTICULAR

Algunas mutaciones del RA se pueden encontrar en casos con criptorquidia bilateral asociadas a AIS. Sin embargo, la relación criptorquidia unilateral con las alteraciones del RA constituyen en la actualidad motivo de controversia, debido a que mutaciones del gen de RA no son observadas en la

mayoría de los pacientes con criptorquidia unilateral (Wiener et al., 1998). En un estudio reciente se ha encontrado que el 63% de los pacientes con testículos localizados en el escroto tenían niveles altos del RA, mientras que el 85% de los pacientes con "mal descenso" testicular los niveles de RA estaban disminuidos y además en los pacientes con testículos intraabdominales los RA eran muy bajos (Hosie, Wessel and Waag, 1999). Sin embargo, otros autores en pacientes con criptorquidia unilateral no encontraron anomalías del gen de RA, por lo que no lo consideran como responsable directo del desarrollo de una criptorquidia aislada (Wiener et al., 1998).

En los testículos criptorquídicos estudiados después de la pubertad, las células de Sertoli tipo adultas mostraban una inmunotinción para el RA de intensidad moderada. En contraste, la intensidad del inmunomarcado del RA fue menor en células de Sertoli inmaduras y disgenéticas (Regadera et al., 2001). Estos hallazgos pudieran sugerir que los segmentos del tubo seminífero con atrofia de células germinales muestran una disminución o ausencia de la expresión del RA en las células de Sertoli disgenéticas (Regadera et al., 2001).

En el AIS, las mutaciones del gen para el RA condicionan diferentes manifestaciones clínicas (Quigley et al., 1995). El AIS sigue un patrón de herencia ligado al cromosoma X, por cada madre portadora, hay 1:2 niños con cariotipo 46 XY que está afectado y 1:2 niñas portadoras. La incidencia de este síndrome es de 1:20.400 recién nacidos (Bangsboll et al., 1992). En la mayoría de los pacientes con AIS, los testículos se encuentran alojados en la cavidad abdominal y menos frecuentemente en el conducto inguinal (Barthold et al., 2000); además, en la infancia el AIS suele descubrirse durante la exploración de una hernia inguinal (Bangsboll et al., 1992). En pacientes postpuberales y fenotípicamente niñas la causa más frecuente de consulta es la amenorrea primaria. Adicionalmente, en algunos individuos con AIS y criptorquidia, la persistencia parcial del conducto de

Müller revela una relación estrecha entre la actividad del RA y la acción de la hormona antimülleriana (AMH). El efecto de la AMH en mediar la regresión del conducto de Müller puede requerir interacción sinérgica con el RA (Quigley et al., 1995).

La mayoría de los cariotipos de estos pacientes son 46,XY, aunque también se han publicado casos de mosaicismo cromosómico (Griffin and Wilson, 1980). Mutaciones en el gen del RA que afectan al desarrollo del fenotipo masculino se expresan en individuos con carga cromosómica 46 XY (Brinkmann, 2001; Quigley et al., 1995). Se han realizado revisiones amplias de la biología molecular del AIS y, aunque en los pacientes con AIS se han descrito más de 150 mutaciones diferentes (Brinkmann, 2001), son cuatro los tipos fundamentales de mutaciones del RA: 1) mutación puntual sencilla consistente en la sustitución de un solo aminoácido o en un prematuro paro de la expresión de su codón; 2) inserción o delección de nucleótidos; 3) una delección completa o parcial del gen, y 4) mutación intrónica que afecta a la secuenciación del ARN del receptor de andrógenos (Brinkmann, 2001).

Se han descrito dos formas clínicas de AIS: síndrome de sensibilidad a los andrógenos completo (CAIS) y el síndrome de insensibilidad a los andrógenos incompleto (IAIS) (Brinkmann, 2001; Quigley et al., 1995).

En el CAIS, el fenotipo característico consiste en la presencia de genitales externos femeninos, una vagina corta y frecuentemente hendida, ausencia o hipoplasia de estructuras derivadas del conducto mülleriano (útero y trompas) y del conducto de Wolf (vía espermatógena), ausencia de próstata, desarrollo de tejido mamario y ausencia de pelos axilares y pubianos (Brinkmann, 2001). El estudio histológico de las gónadas de estos pacientes con CAIS demuestran cambios semejantes en testículos criptorquídicos, aunque en algunos casos las lesiones suelen ser menores (Álvarez-Nava et al., 1997). Sin embargo, los cambios histológicos en el testículo extirpado de pacientes adultos con

AIS es similar al de algunas criptorquidias aunque también pueden semejar testículo inmaduro e incluso testículo infantil normal (Morris and Mahesh, 1963; Nistal and Paniagua, 1996). Los adenomas de células de Sertoli son frecuentes en los testículos de estos pacientes, aunque se consideraron en publicaciones clásicas algunas diferencias histológicas testiculares entre las formas completa e incompleta de AIS (Teter and Boczkowski, 1966; Damjanov, Drobnjak and Grizelj, 1971), trabajos posteriores de amplias series de pacientes concluyeron que no existían diferencias histológicas relevantes en los testículos entre los dos tipos de AIS (Rutgers and Scully, 1991). En los pacientes con CAIS, los niveles de testosterona basal y después de la estimulación con HCG (Galli-Tsinopoulou et al., 2003) están elevados en la edad puberal (Brinkmann, 2001); mientras que, los niveles basales de gonadotropinas pueden ser normales (Galli-Tsinopoulou et al., 2003) aunque también pueden encontrarse niveles elevados de la LH (Galli-Tsinopoulou et al., 2003). Los niveles séricos de testosterona estuvieron ligeramente disminuidos en los pacientes adultos y ligeramente elevados en los pacientes prepuberales. El nivel de estradiol sérico estuvo ligeramente aumentado en todos los pacientes (Regadera et al., 1999).

Histopatológicamente, en los pacientes adultos con AIS se ha encontrado una disminución del volumen testicular y una alternancia de áreas modulares con áreas difusas. El diámetro tubular estaba significativamente disminuido y la densidad del volumen de los túbulos seminíferos estaba aún más reducida (Jockenhovel et al., 1993). Característicamente, en los testículos de los pacientes con AIS no se encontraron células germinales ni tampoco células de carcinoma *in situ*.

En el IAIS, los cambios fenotípicos son muy diversos, aunque en la mayoría de estos pacientes predomina la apariencia femenina con genitales ambiguos, mientras que en otros casos existe un predominio del fenotipo masculino y cuando llega la puber-

tad a estos pacientes se produce también una elevación de los niveles séricos de testosterona, LH y estradiol (Brinkmann, 2001). Por otro lado, existe una variante clínica peculiar de AIS denominada enfermedad de Kennedy en la que se asocia alteraciones del desarrollo neurológico -caracterizadas por atrofia bulbar y espinal asociada a atrofia muscular- y anomalías cuantitativas del RA que se relacionan con la severidad de los síntomas del AIS (MacLean HE, 1995) En todos estos casos de síndrome de Kennedy existe una correlación entre la longitud repetida de CAG y el desarrollo temprano de enfermedad neurológica, por lo que se demuestra que esta enfermedad tiene una relación directa con alteración de la secuencia del RA (Dejager et al., 2002). Por último, se ha descrito todo un espectro de individuos con síntomas intermedios de AIS en los que el diagnóstico se descubre en la evaluación de una infertilidad de causa desconocida (Brinkmann, 2001). Dentro de estas variantes clínicas cabe destacar varios estudios de pacientes con hipospadias severas y criptorquidia bilateral en los que puede existir alteraciones del RA (Holmes, Miller & Baskin, 2004), incluidas la mutación puntual en el exón 8 (Hiort et al., 1994). Sin embargo, en la mayoría de los casos de hipospadia no se centraron en mutaciones específicas, por lo que es necesario establecer criterios genéticos que permitan clasificar y tratar correctamente estos casos (Hiort et al., 1994). Todo este espectro de enfermedades permiten concluir que las variaciones fenotípicas en los defectos moderados del RA pudieran no detectarse en individuos adultos con AIS durante la exploración clínica (Galli-Tsinopoulou et al., 2003). Pero los datos aún no son claros, ya que numerosos estudios han demostrado una considerable heterogeneidad en la expresión del RA, dependiendo de si se trata de pacientes con CAIS o con IAIS; esta diferente inmunexpresión también ocurre cuando se estudian biopsias de cáncer de próstata y en biopsias testiculares (Ávila, Zoppi and McPhaul, 2001). En los pacientes con IAIS, el estudio de la secuencia directa de los exones que codifican el gen de RA generalmente

no revelan anomalías de este gen (Isurugi et al., 1996). Es más, defectos parciales en la función del RA están causados por sustituciones de aminoácidos del dominio hormonal activo del RA en la cadena del ADN. Estos defectos parciales funcionales del gen del RA pueden determinar claramente cambios funcionales pero también alteraciones cuantitativas en la abundancia del receptor (Ávila, Zoppi and McPhaul, 2001). De hecho, mutaciones en el gen del RA son las causas de alteraciones de la función del receptor, por lo que mutaciones diversas pueden asociarse con signos clínicos heterogéneos de AIS (Hiort et al., 1994; Brown, 1995).

En pacientes subfértiles con oligozoospermia y niveles de gonadotropinas séricas normales, la intensidad de la inmunexpresión del RA variaba sustancialmente entre las biopsias de los diferentes pacientes (van Rooijen et al., 1995), no encontrándose una correlación entre la intensidad de la inmunexpresión del RA en las células de Sertoli y en células mioideas con respecto al grado de maduración de la espermatogénesis. Además, los niveles de inmunexpresión del RA en las células de Sertoli y las células mioideas peritubulares no están regulados directamente por los niveles séricos de gonadotropinas. Estos resultados indican que la inmunodetección del RA no se relaciona con la calidad del epitelio espermático en pacientes con oligozoospermia (van Rooijen et al., 1995; Singh et al., 2006). Asimismo, en otro estudio no se han encontrado cambios evidentes de inmunexpresión del RA como un marcador de función testicular o con el grado de hipospermatogénesis, ni tampoco con el grado de diferenciación de las células de Sertoli (Saunders et al., 1996; Jarow and Zirkin, 2005; Aiman and Griffin, 1982). Pero los datos aún no son concluyentes ya que otros autores han medido la inmunexpresión del RA en fibroblastos de piel genital, observando que la resistencia a los andrógenos puede ser la causa de una fracción importante (40% o más) de infertilidad idiopática, debida a azoospermia o severa oligozoospermia (Saunders et al., 1996); por lo que en la actualidad se están diseñando

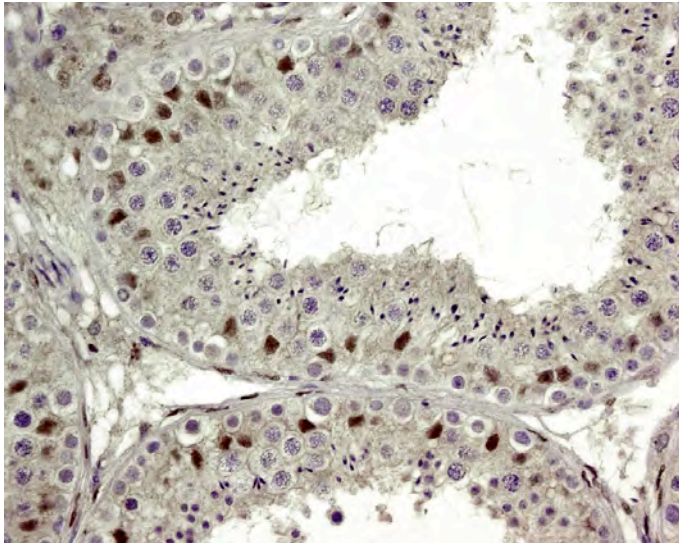


Fig. 1. Intensa Expresión del Receptor de Andrógenos en los núcleos de las células de Sertoli en un hombre joven con espermatogénesis normal.

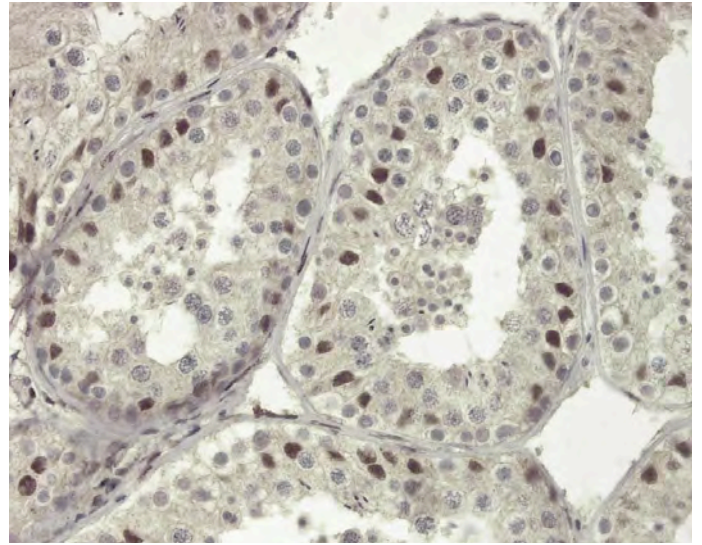


Fig. 2. Tubos seminíferos con atrofia moderada en un hombre de edad avanzada. Nótese la conservación de la expresión del Receptor de Andrógenos.

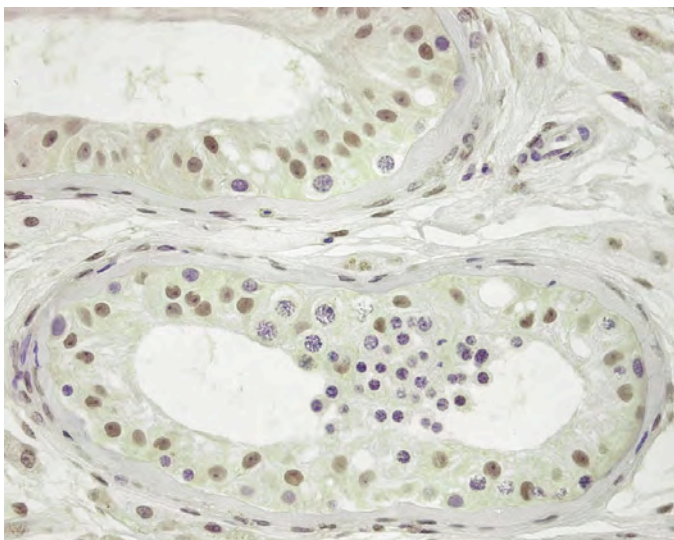


Fig. 3. Distribución irregular e intensidad variable de la expresión del Receptor de Andrógenos en un caso de criptorquidia bilateral postpuberal con incompleta diferenciación de células germinales.

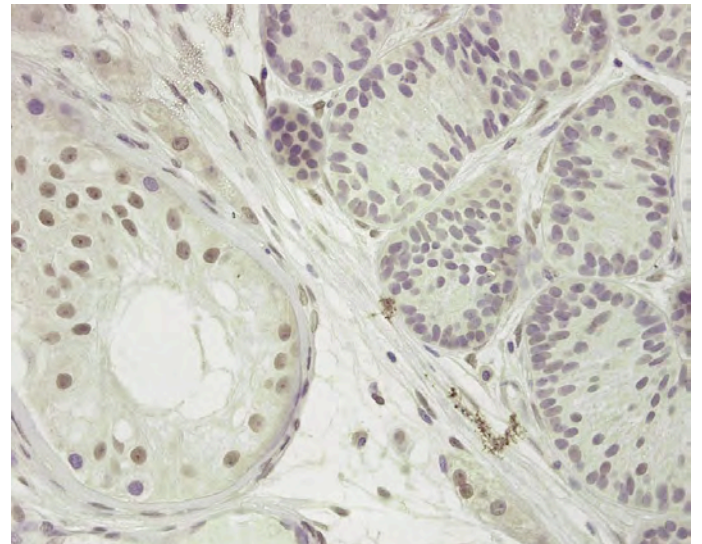


Fig. 4. Biopsia de testículo criptorquídico extirpado después de la pubertad. Tubo seminífero con crecimiento puberal y moderada expresión del Receptor de Andrógenos en sus células de Sertoli (izquierda). En la vecindad se observan varios tubos seminíferos de tipo infantil (derecha) con mínima o ausencia de expresión del Receptor de Andrógenos en las células de Sertoli disgenéticas.

modelos de ratones con mutaciones CAG del RA con el fin de evaluar el grado de diferenciación de la células de Sertoli en relación a alteraciones de la espermatogénesis (Yu et al., 2006).

CONCLUSIONES

El RA pertenece a la superfamilia de receptores intranucleares, cuya respuesta final se lleva a cabo a través de su unión con el ADN. Está estrechamente relacionado con la diferenciación sexual del varón. La activación normal del RA permite un buen desarrollo y diferenciación de los órganos internos y externos masculinos.

En el testículo del hombre adulto, la inmunoexpresión del RA es detectada exclusivamente en el núcleo de células de Sertoli, células de Leydig y células mioideas peritubulares. La función de estas células está estrechamente relacionada a la concentración y expresión del RA. La inmunolocalización del RA citoplasmática no se ha observado en estructuras testiculares humanas.

Mutaciones en el RA condicionan alteraciones en la acción de los andrógenos, afectando la función endocrina a nivel testicular y de otros órganos diana, comprometiendo además la función reproductiva. Algunas mutaciones del RA están implicadas en casos con testículos criptorquídicos. La relación de las alteraciones del RA con el desarrollo de un testículo no descendido unilateralmente es aún motivo de controversia, debido a que mutaciones del gen de RA no son observadas en la mayoría de los pacientes con criptorquidia unilateral. El AIS es la manifestación clínica más evidente de mutaciones en el RA. Las mutaciones más frecuentemente observadas consisten en lesiones puntuales en cambios de secuencias de aminoácidos, delección de nucleótidos o delección parcial o completa del gen. Su forma completa (CASI) se presenta fenotípicamente como sexo femenino. En el AIS existe una considerable heterogeneidad en la expresión del RA que depende de la penetrancia de la mutación.

En hombres infértiles no se han encontrado cambios evidentes de inmunoexpresión del RA que lo convirtieran en un marcador de función testicular, y todavía es prematuro en patología reproductiva humana predecir el grado de hipospermatogénesis o el grado de desdiferenciación de las células de Sertoli solo teniendo en cuenta las alteraciones de expresión génica e histopatológica del RA, dado que hasta la actualidad el grado de expresión del RA no se relaciona con las alteraciones de diferenciación del epitelio espermático presentes en los pacientes subfértiles.

BIBLIOGRAFÍA

Aiman J, Griffin JE. The frequency of androgen receptor deficiency in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982; 54:725-32.

Álvarez-Nava F, González S, Soto M, Martínez C, Prieto M. Complete androgen insensitivity syndrome: clinical and anatomopathological findings in 23 patients. *Genet Couns*, 1997; 8:7-12.

Ávila DM, Zoppi S, McPhaul MJ. The androgen receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001; 76:135-42.

Bangsbo S, Qvist I, Lebech PE, Lewinsky M. Testicular feminization syndrome and associated gonadal tumors in Denmark. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1992; 71:63-6.

Barthold JS, Kumasi-Rivers K, Upadhyay J, Shekarriz B, Imperato-Mcginley J. Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *J Urol*, 2000; 164:497-501.

Bonaccorsi L, Muratori M, Carloni V, Zecchi S, Formigli L, Forti G, Baldi E. Androgen receptor and prostate cancer invasion. *Int J Androl*, 2003; 26:21-5.

Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*, 2001; 179:105-9.

Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HH. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1989; 44:264-9.

Brown TR. Human androgen insensitivity syndrome. *J Androl*, 1995; 16:299-303.

Damjanov I, Drobnjak P, Grizelj V. Testicular Feminization with immature Leydig cells. An ultrastructural demonstration. *Am J Obstet Gynecol*, 1971; 110:594-6.

Dejager S, Bry-Gauillard H, Bruckert E, Eymard B, Salachas F, LeGuern E, Tardieu S, Chadarevian R, Giral P, Turpin G. A comprehensive endocrine description of Kennedy's disease revealing androgen insensitivity linked to CAG repeat length. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87:3893-901.

Denmeade SR, Sokoll LJ, Dalrymple S, Rosen DM, Gady AM, Bruzek D, Ricklis RM, Isaacs JT. Dissociation between androgen responsiveness for malignant growth vs expression of prostate specific differentiation markers PSA, hK2, and PSMA in human prostate cancer models. *Prostate*, 2003; 54:249-57.

Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Finger MJ, Moul JW, Srivastava S. Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. *Cancer Res*, 1994; 54:2861-4.

Galli-Tsinopoulou A, Hiort O, Schuster T, Messer G, Kuhnle U. A novel point mutation in the hormone binding domain of the androgen receptor associated with partial and minimal androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2003; 16:149-54.

- Griffin JE; Wilson JD. The syndromes of androgen resistance. *New Engl J Med*, 1980; 302:198-209.
- Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Transformation of the androgen receptor to the deoxyribonucleic acid-binding state: studies in homogenates and intact cells. *Endocrinology*, 1987; 120:1914-20.
- Hiort O, Klauber G, Cendron M, Sinnecker GH, Keim L, Schwinger E, Wolfe HJ, Yandell DW. Molecular characterization of the androgen receptor gene in boys with hypospadias. *Eur J Pediatr*, 1994; 153:317-21.
- Holmes NM, Miller WL, Baskin LS. Lack of defects in androgen production in children with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89:2811-6.
- Hosie S, Wessel L, Waag KL. Could testicular descent in humans be promoted by direct androgen stimulation of the gubernaculum testis? *Eur J Pediatr Surg*, 1999; 9:37-41.
- Housley PR, Sanchez ER, Danielsen M, Ringold GM, Pratt WB. Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. *J Biol Chem*, 1990; 265:12778-81.
- Isurugi K, Hasegawa F, Shibahara N, Mori H, Shima H, Harada N, Hasegawa T, Honma S, Imasaki K, Nawata H. Incomplete testicular feminization syndrome: studies on androgen receptor (AR) function, AR gene analysis, and aromatase activities at puberty and long-term observations of clinical and hormonal features from infancy to puberty. *Endocr J*, 1996; 43:557-640.
- Iwamura M, Abrahamsson PA, Benning M, Cockett AT, di Sant'Agnese PA. Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *J Histochem Cytochem*, 1994; 42:783-8.
- Janssen P, Brinkman AO, Boersma WJ, van der Kwast Th. Immunohistochemical detection of the androgen receptor with monoclonal antibody F39.4 in routinely processed, paraffin-embedded human tissues after microwave pretreatment. *J Histochem Cytochem*, 1994; 42:1169-75.
- Jarow JP, Zirkin BR. The androgen microenvironment of the human testis and hormonal control of spermatogenesis. *Ann Y Acad Sci*, 2005; 1061:208-20.
- Jockenhovel, Rutgers JK, Mason JS, Griffin JE, Swerdloff RS. Leydig cell neoplasia in a patient with Reifenstein syndrome. *Exp Clin Endocrinol*, 1993; 101:365-70.
- Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *J Biol Chem*, 1992; 267:968-74.
- Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, French FS. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989; 86:9534-8.
- MacLean HE, Choi WT, Rekaris G, Warne GL, Zajac JD. Abnormal androgen receptor binding affinity in subjects with Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy). *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80:508-16.
- Morris JM, Mahesh VB. Further observations on the syndrome "Testicular Feminization". *Am J Obstet Gynecol*, 1963; 87:731-48.
- Nance MA. Clinical aspects of CAG repeat diseases. *Brain Pathology*, 1997; 7:881-900.
- Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB, Brown TR, Barrack ER. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89:6319-23.
- Nistal M, Paniagua R. Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG, Eble JN, eds. *Urologic Surgical Pathology*. St Louis: Mosby Inc; 1996: 496-5132.
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspective. *Endocrine Rev*, 1995; 16:271-321.
- Regadera J, Martínez-García F, González-Peramato P, Serrano A, Nistal M, Suárez-Quian C. Androgen receptor expression in sertoli cells as a function of seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:413-21.
- Regadera J, Martínez-García F, Paniagua R, Nistal M. Androgen insensitivity syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, 1999; 123:225-34.
- Ruizeveld de Winter JA, Trapman J, Vermey M, Mulder E, Zegers ND, van der Kwast ThH. Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem. Cytochem*, 1991; 39:927-36.
- Rutgers, JL; Scully, RE. The androgen insensitivity syndrome (testicular feminization): a clinocopathologic study of 43 cases. *Int J Gynecol Pathol*, 1991; 10:126-44.
- Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, 1990; 127:3180-6.

Saunders, PTK, Millar, MR, Majdic G, Bremner WT, McLaren TT, Grigor KM, Sharpe RM. Cellular and Molecular Regulation of Testicular Cells. In: C. Desjardins Ed. Proceedings of the XIIIth Testis Workshop on Cellular and Molecular Regulation of Testicular Cells sponsored Serono Symposia USA, New York: Springer; 1996: 213-220.

Singh R, Deepa SR, Madhavi S, Gupta NJ, Chakravarty B, Singh L, Thangaraj K. Male infertility: no evidence of involvement of androgen receptor gene among Indian men. *J Androl*, 2006; 27:102-5.

Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev*, 1991; 12:45-77.

Suárez-Quian C, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84:350-8

Teter J, Boczkowski, K. Testicular feminization with and without clitoral enlargement. *Am J Obstet Gynecol*, 1966; 94:813-9.

Van Roijen JH, Van Assen S, van der Kwast Th H, de Rooij DG, Boersma W, Vreeburg J, Weber R. Androgen receptor immunoexpression in the testes of subfertile men. *J Androl*, 1995; 16:510-6.

Van Roijen JH, Van Assen S, Van Der Kwast TH, De Rooij DG, Boersma J, Vreeburg JT, Weber RF. Androgen receptor immunoexpression in the testes of subfertile men. *J Androl*, 1995; 16:510-6.

Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suárez-Quian C. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 1994; 134:2307-16.

Wiener JS, Marcelli M, Gonzales ET Jr,

Roth DR, Lamb DJ. Androgen receptor gene alterations are not associated with isolated cryptorchidism. *J Urol*, 1998; 160:863-5.

Wiener JS, Teague JL, Roth DR, Gonzales ET Jr, Lamb DJ. Molecular biology and function of the androgen receptor in genital development. *J Urol*, 1997; 157:1377-86.

Yu Z, Dadgar N, Albertelli, Scheller A, Albin RL, Robins DM, Lieberman AP. Abnormalities of germ cell maturation and Sertoli cell cytoskeleton in androgen receptor 113 CAG knock-in mice reveal toxic effects of the mutant protein. *Am J Pathol*, 2006; 168:195-204.

Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H. Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec*, 1996; 245:509-18.



El modo más sencillo, práctico y fiable de incorporar el Diagnóstico Genético Preimplantacional a su centro de FIV

NUESTRA EXPERIENCIA EN DGP: 7.125 CICLOS (DIC 2005)

REALIZAMOS
Test de aneuploidías, reorganizaciones cromosómicas y enfermedades monogénicas

OFRECEMOS
Programación inmediata - Alta experiencia - Continua innovación tecnológica

NOTICIAS

1. Resultados de la votación para la elección / reelección de miembros de la Junta Directiva de ASEBIR

Candidata/o	votos
Begoña Arán Corbella	72
Nieves Cremades Hernández	75
Esther Fernández García	52
Mark Grossmann i Camps	82
Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta	66
Fernando Marina Reguero	64
Jorge Ten Morro	65

Acorde con los estatutos la composición de la Junta Directiva resultante de las elecciones queda como sigue:

Cargo dentro de la Junta Directiva

Presidente	Antonio L. González-Utor
Vicepresidenta	Carmen Ochoa Marieta
Secretaria y Vocalía de Congresos	Begoña Arán Corbella
Tesorero	Manuel Ardoy Vilches
Vocalía de Congresos	Mª José de los Santos Molina
Vocalía de Docencia y Formación	Jorge Martín Cuadros Fernández
Vocalía de Docencia y Formación	Juan Manuel Moreno García
Vocalía de Página WEB	Jorge Ten Morro
Vocalía de Publicaciones	Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
Vocalía de Publicaciones	Nieves Cremades Hernández
Vocalía de Publicaciones	Mark Grossmann i Camps
Vocalía de Relaciones Públicas	Fernando Marina Rugero

2. III CONGRESO ASEBIR

Apreciados amigos y compañeros:

Ya ha pasado suficiente tiempo desde nuestro congreso como para hacer un repaso de todo lo que allí aconteció. Y nuestra conclusión, con vuestro permiso, no ha podido ser más positiva. Hemos seguido creciendo en asistencia (260 inscripciones) y presentación de trabajos (14 Ponencias; 108 Comunicaciones presentadas, de las cuales 32 como comunicación oral) y una conferencia magistral a cargo del Dr. Antonio Bernad (Investigador del CSIC, Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid). Un año más, se otorgó el Premio EMB a la mejor comunicación que este año fue entregado al trabajo: "Expresión de ZP3 Recombinante Humana Biológicamente activa en células CHO" que firmaban M^a Jiménez-Movilla y col., del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Murcia. Vivimos momentos emotivos al nombrar Socia Honorífica de nuestra sociedad a Anna Veiga. La entrega del galardón, así como nuestro reconocimiento a su dilatada labor profesional y arduo trabajo en ASEBIR fue realizado por nuestro Presidente, Antonio L. González-Utor.

Hemos contado con la colaboración y esponsorización de las principales empresas relacionadas con nuestra especialidad (12 Stands instalados y 20 Entidades colaboradoras y/o expositoras), nuestro campo científico parece no tener límite... ¿Qué más podemos pedir? Bueno, si, algo querría pedir, y es que no vuelva a pasar lo que sucedió en la reunión de la Asamblea. La gente de la junta está trabajando muy duro por todos nosotros (estar seguros de ello) y no se merecen el desplante que les hicimos, ni contribuye en absoluto a la buena salud de nuestra asociación.

Pero broncas aparte, volviendo al hilo de la carta, espero que nosotros, el comité organizador, os hayamos hecho disfrutar tanto en lo científico como en lo lúdico, con actuaciones originales como Los tambores y el de la cara pintada y con Salvatore y el morro que le echaba. (¿habéis visto las fotos?), y que en estos dos días de convivencia hayáis aprendido y disfrutado a partes iguales con ese "punto" de cordialidad e informalidad que hemos intentado darle.

Y sobre todo, espero veros a todos en Bilbao.

Y en la Asamblea.

Y... ¿Qué más puedo deciros?

Que ha sido un placer trabajar para vosotros

Antonio Urries López

Presidente del Comité Organizador ASEBIR 2005

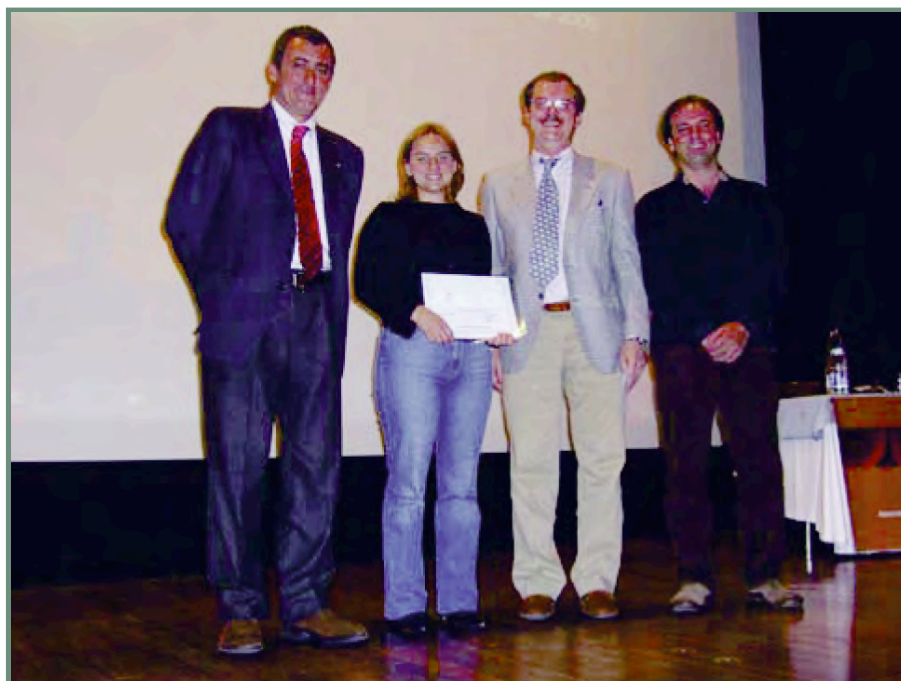
3. GALERÍA PARA EL RECUERDO



Gran participación de socios en presentación de trabajos y asistencia.
La sala de Pósters,
estratégicamente situada, estuvo muy animada.



El título de Socia Honoraria recayó en nuestra querida Anna Veiga. El actual Presidente, Antonio L. González-Utor, hizo entrega del premio en reconoci-



Un año más contamos con el Premio otorgado por EMB a la mejor comunicación. En imagen izquierda a derecha, el artífice de este premio Sergio Oliveró, la ganadora M^a Jiménez, el Presidente de ASEBIR, Antonio L. González-Utor y el Presidente del Comité Organizador, Antonio Urries.

Aprovechamos estas líneas para agradecer



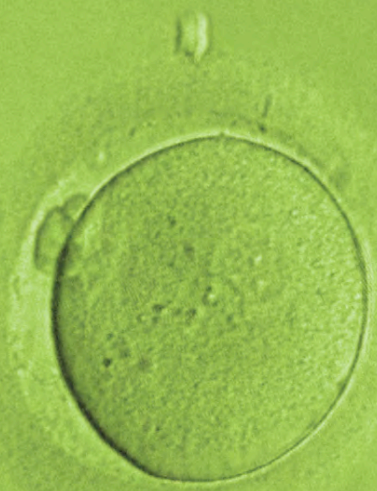
Además de unas jornadas de trabajo intenso, hubo tiempo para saludar a los amigos. Todos los eventos estuvieron muy bien organizados y causaron sensación en los invitados.

CENA DE GALA

La cena de la gala fue el colofón a unos días intensos de trabajo.



La liberación de energía se hizo patente en las ganas de cantar y bailar



Somos los primeros
en conocerte ...

www.centromedicinaembrionaria.com

SERVICIOS

Servicio de diagnóstico genético preimplantacional

Estudio de aneuploidías
Estudio de reorganizaciones cromosómicas
Estudio de enfermedades monogénicas
Formación en las técnicas de biopsia y fijación

Servicio de biopsia testicular y estudio de meiosis

Realización de la biopsia testicular
Asesoramiento sobre la técnica de biopsia testicular
Valoración y asesoría de los resultados del estudio de meiosis

FISH en espermatozoides

Consejo genético

Álvarez de Baena, 4 · 28006 Madrid · Tf. 91 4115080
Fax 91 411 50 81 · dgpi@centromedicinaembrionaria.com

Servicio de Diagnóstico Genético Preimplantacional

Dra. Esther Velilla García
Dra. María Oter Renom
Dra. Mercedes García Bermúdez

Servicio de Andrología

Dr. Ferran García José
Dra. Susana Egozcue Vilarasau



centro de medicina
embrionaria

www.centromedicinaembrionaria.com

... y sabemos que
crecerás sano



AGENDA

The 22nd Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction (ESHRE)
June 18–21, 2006. Prague, Czech Republic.
ESHRE congress: www.eshre.com

**The Second EMBIC Summer School
“Molecular Mechanisms of Implantation”**
Pécs, Hungary
July 1–4, 2006
Contacto: Prof. Julia Szekeres–Bartho
e–mail: szjuli@main.pote.hu
Web–site: www.embic.org

Basic hESC Practical Training Course
University of Sheffield, UK
July 4–6, 2006
Centre for Stem Cell Biology, University of Sheffield, UK.
Contacto: Miss Claire Herridge
e–mail: c.herridge@sheffield.ac.uk
Web–site: <http://www.cscb.shef.ac.uk/Training1/SUMMERSCHOOL200511>

CSCB 4th International Symposium, "Progress Towards Cell Therapies"

University of Sheffield, UK

July 14th, 2006

Centre for Stem Cell Biology, University of Sheffield, UK.

Contacto: Miss Claire Herridge

e-mail: c.herridge@sheffield.ac.ukWeb-site: <http://www.cscb.shef.ac.uk/Training1/InternationalOneDaySymposium/>**39th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**

Nebraska, USA

July 29, 2006 – August 1, 2006

Qwest Center Omaha, Omaha, Nebraska, U.S.A.

Contacto: Judith Jansen

e-mail: ssr@ssr.orgWeb-site: <http://www.ssr.org>**Reproduction and malignant disease**

Barcelona, Spain

15–16 September, 2006

Contacto: Serono Symposia International Foundation

E-mail: info@seronosymposia.org

Website:

http://www.seronosymposia.org/reproductive/event_descrip.ihtml?id=262

**8th World Congress on Controversies in
Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI)**

Sptembre 14–17, 2006. Salvador – Bahia, Brasil.

COGI congress: cogi_reg@comtecint.com

**10th International
Symposium on Spermatology**

17 a 22 septiembre 2006. Madrid, España

Technical Secretariat: Unicongress – Atlanta Viajes

e-mail: secretariat@spermadrid2006.org

Web: <http://www.spermadrid2006.org>

**Second Asia-Pacific
Forum on Andrology**

Shanghai, China

October 19–23, 2006

Contacto: Ms Hui Zhang

e-mail: apfa@sibs.ac.cn

Web-site:

<http://2apfa.asiaandro.com/login.asp><http://www.conference.ac.cn/apfa.htm>

ONLINE SUBMISSION.

**American Society for
Reproductive Medicine**

62nd Annual Meeting

October 21–25, 2006

New Orleans, Louisiana

Web-site: <http://www.asrm.org/whatsnew.html>

ART in the 21st Century: A Time for Reflection and New Horizons - Part 2

Amsterdan, The Netherlands

November 10-11, 2006

Contacto: William Schoolcraft

E-mail: info@seronosymposia.org

Web-site:

http://www.seronosymposia.org/reproductive/event_descrip.ihtml?id=288

4th International Workshop on Epididymis

04 a 07 Diciembre 2006

Clermont-Ferrand, Francia

Joel Drevet

e-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr

global[®]

Un solo medio...sin necesidad de usar medios secuenciales

DIA I → Blastocito

Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
Dia 5

CE

DISTRIBUIDO POR

Quermed, s.a.

LifeGlobal
THE ART MEDIA COMPANY

www.LifeGlobal.com

Q
Quermed, s.a.
electromedicina

EQUIPOS PARA LABORATORIO DE F.I.V.

← **OOSIGHT**

SISTEMA NO INVASIVO PARA LA OBSERVACIÓN "IN VIVO" DEL HUSO MEIOTICO, EN LOS OVOCITOS

SATURN LASER →

EQUIPO UTILIZADO PARA LA TECNICA "ASSISTED HATCHING" Y LA BIOPSIA EMBRIONARIA PGD

← **MICROMANIPULADOR INTEGRATI**

SISTEMA DE MICROMANIPULACION INTEGRATI, CON MICROSCOPIO

División de Reproduccion Humana
Telf. 902102163 // Fax 915040440
www.quermed.com // anaortiz@quermed.com

Información para los Autores

Normas de Publicación

NORMAS DE PUBLICACIÓN

La revista ASEBIR es una publicación del ámbito de la Biología de la Reproducción abierta a considerar cuantos trabajos afines a esta área de conocimiento puedan adaptarse a uno de los siguientes apartados: Artículos Originales; Temas de Actualización o Debates. Además, la revista ASEBIR da cabida a la actualidad en sus secciones de Noticias y Agenda.

La revista ASEBIR se publica semestralmente por lo que es indispensable que los escritos para las secciones de Debates, Noticias y Agenda sean enviados antes del 30 de Abril para el primer número del año (Junio) y antes del 15 de Noviembre para el segundo número del año (Diciembre).

Los originales deben enviarse a: Secretaría de ASEBIR, C/ Fernández Caro 44, Oficina 2. 28027 (Madrid). Se recomienda utilizar sobres que protejan adecuadamente el contenido informático.

Manuscritos: Todos los trabajos remitidos deberán ser inéditos y se presentarán en un manuscrito original y dos copias impresas, a doble espacio en hojas din A4, así como también en soporte informático. Se acompañarán de una carta de presentación en la que se solicite su valoración y se indique la sección donde se desea su publicación. En esta carta debe constar claramente que el trabajo no ha sido publicado previamente y que todos los autores están de acuerdo en su contenido y ceden los derechos de su publicación a ASEBIR. Para la reproducción de material ya editado es necesaria la autorización expresa de los propietarios del copyright.

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

En la primera página de todos los traba-

jos se indicará, en el siguiente orden: título en castellano; título en inglés; nombre y apellido de cada uno de los autores y nombre completo del centro, con la dirección para correspondencia, incluido correo electrónico. En la segunda página se incluirá un resumen y las palabras clave (ambos en castellano e inglés). La estructura de los manuscritos preferentemente deberá organizarse en los apartados de Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Bibliografía, Tablas y Gráficas. Las tablas se numerarán con números romanos y las figuras con números arábigos. Los pies de figura se imprimirán en hoja aparte y cada figura llevará escrito en el dorso su numeración.

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

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

A) Artículo de revista con menos de 6 autores:

Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril*

1993;59:418-423.

B) Artículo de revista con más de 6 autores:

Marrama P, Baraghini GF, Carani C, Celani MF, Giovenco P, Grandi F, et al. Further studies on the effect of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligo-asthenozoospermia. *Andrologia* 1985;17:612-616.

C) Libro completo:

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

D) Capítulo de libro:

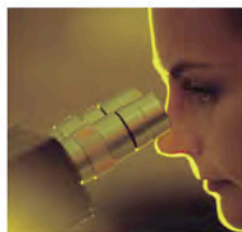
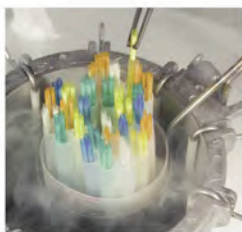
Siracusa G, Felici M, Salustri A. Meiotic maturation of the mammalian oocyte. En: Ach RH, Balmaceda JP, Johnston I, editors. *Gamete Physiology*. 2º ed. New York: Raven Press; 1990. p. 129-144.

E) Comunicación a congreso:

Bengston S, Solheim. Hatching assisted. XXII Meeting of European Society of Human Reproduction and Embriology; 1997 Jun20-23; Roma, Italia. p. 1561-2.

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

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



BANCO DE SEMEN

Seguridad, calidad y garantía.

> SEGURIDAD EN LA CONGELACIÓN

- Pajuelas CBS de alta seguridad
- Llenado y termosellado automático
- Medios de congelación certificados

> SEGURIDAD EN EL ALMACENAMIENTO

- Bombonas de cuarentena
- Trazabilidad de todo el proceso

> SEGURIDAD EN EL TRANSPORTE

- Contenedores homologados
- Embalaje de seguridad
- Trazabilidad de temperatura
- Plazos de entrega precisos

> SISTEMA CALIDAD ISO 9001:2000

- Certificación por AENOR

> CONTROL DE CALIDAD

- Participación Control Calidad ESHRE
- Participación Control Calidad ASEBIR
- Test descongelación a cada muestra
- Cultivo microbiológico a cada muestra

> GARANTÍA EN SCREENING DE DONANTES

- Cumplimiento normativa española
- Cumplimiento recomendaciones científicas internacionales
- Realización cariotipo
- Estudio portadores fibrosis quística
- Estudio portadores atrofia muscular espinal
- Despistaje alteraciones hematológicas y de coagulación
- Despistaje alteraciones bioquímicas
- Banco DNA para estudios posteriores