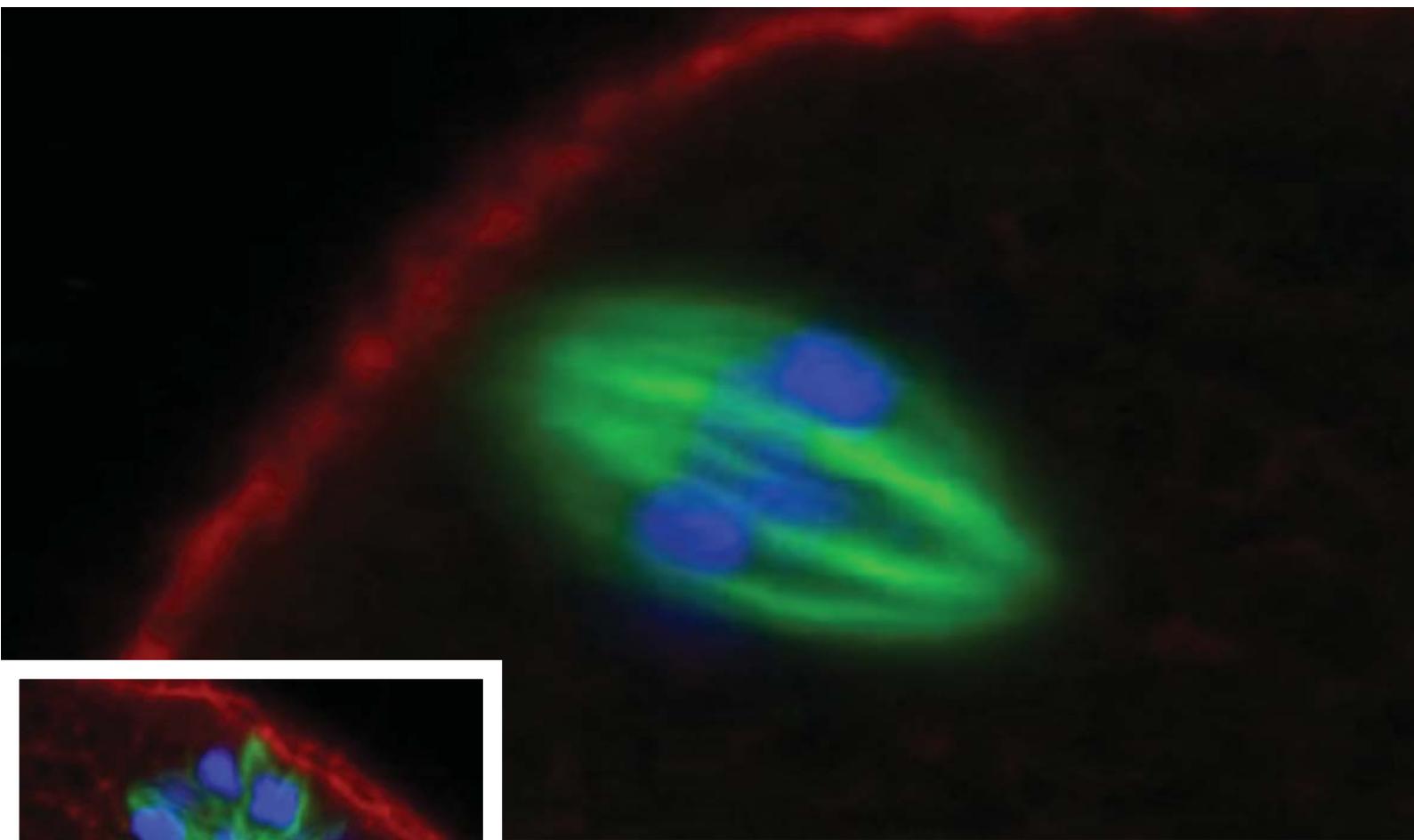


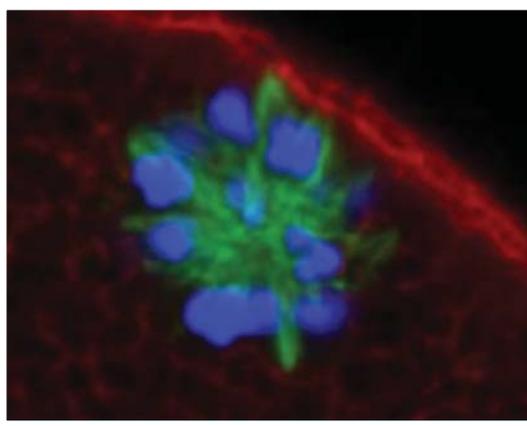
REVISTA

ASEBIR

Junio 2010 Vol.15 · Nº1



Complejo huso meiótico-placa metafásica



ACTUALIDAD

Proteómica del espermatozoide humano.
Metabolómica y reproducción humana.

ARTÍCULOS

Efecto del proceso de vitrificación sobre la estructura del huso meiótico y organización cromosómica en ovocitos humanos en metafase II.

Las variantes cromosómicas afectan la calidad embrionaria.

AULA JOVEN

Relación entre los patrones pronucleares y la calidad embrionaria según criterios asebir.

DEBATE

Es necesario considerar los intentos previos.
Auditorías para el 100% de los Centros.
Transparencia no siempre es sinónimo de honestidad.

La nueva vía del Registro de Actividad de la SEF: El aumento de la calidad.

FORMACIÓN CONTINUADA

Impronta genómica y reproducción asistida.

AGENDA NOTICIAS

NORMAS DE PUBLICACIÓN

Vit Kit[®] - Freeze and Vit Kit[®] - Thaw



- Scientifically proven formulation that increases pregnancy rates*
- First vitrification media cleared by the FDA
- Superior DMSO based media



Para más información : irvine@izasa.es o visite nuestra web www.izasa.es

Only from Irvine Scientific



IrvineScientific[®]
Grow With Us™

ASEBIR

SUMARIO

SUMARIO	Pág.
EDITORIAL	3
Reconocimiento de la Embriología Clínica Carmen Ochoa, Antonio González, Josep Santaló y Manuel Ardoy Comisión para la Especialidad de Embriología Clínica	
ACTUALIDAD	5
Proteómica del espermatozoide humano Rafael Oliva Virgili, Josep Maria Estanyol, Sara de Mateo López, Judith Castillo Corullón, José Luis Balleascà Lagarda.	
Metabólica y reproducción humana Imma Sánchez Ribas, Francisco Domínguez, Carlos Simon	
ARTÍCULOS	14
Efecto del proceso de vitricación sobre la estructura del huso meiótico y organización cromosómica en ovocitos humanos en metafase II Cristina Costana Duque, Javier Alfonso, Rita Cervera, Ana Monzó, Vicente Montañana, Miodrag Stojkovic, Alberto Romeu	
Las variantes cromosómicas afectan la calidad embrionaria Mireia Poveda, Teresa Rubio, Isabel Ochoa, Laura Gil, Manuel Lloret, José Jesús López-Gálvez, Antonio Urbano, Juan Manuel Moreno, Joaquín Rueda	
AULA JOVEN	25
Relación entre los patrones pronucleares y la calidad embrionaria según criterios asebir Marta Brossa, Xènia Blanch, Marta Antich	
DEBATE	30
Es necesario considerar los intentos previos Auditorías para el 100% de los Centros Transparencia no siempre es sinónimo de honestidad La nueva vía del Registro de Actividad de la SEF: El aumento de la calidad.	
FORMACIÓN CONTINUADA	36
Impronta genómica y reproducción asistida Cristina Camprubí	
AGENDA	42
NOTICIAS	43
INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES - NORMAS DE PUBLICACIÓN	44

EDITA

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

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Marga Esbert - Barcelona

Jorge Cuadros - Madrid

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Dr. Manuel Ardoy Vilches

HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

Vicepresidenta y RPPP:

Dra. Carmen Ochoa Marieta

CER. CLINICA COTERO - Santander

Secretaría y RPPP:

Dra. Montserrat Boada Palá

INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero

INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

Vocalía de Grupos de Interés e Investigación:

Dr. Josep Santaló Pedro

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

Vocalía de congresos:

Dra. María José Torelló Ybañez

HOSPITAL QUIRÓN BARCELONA - Barcelona

Dra. Yolanda Mínguez Royo

IVI MADRID - Madrid

Vocalía de Docencia y formación continuada:

Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel

INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA - IERA - Badajoz

Dr. Josu Franco Iriarte

CENTRO SANITARIO VIRGEN DEL PILAR - San Sebastian

Dr. Juan Manuel Moreno García

CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

Vocalía Página Web:

Dr. Juan Manuel Moreno García

CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

Vocalía de publicaciones:

Dr. Jorge Martín Cuadros Fernández

CLÍNICA FIV-MADRID - Madrid

Dra. Marga Esbert Algam

IVI BARCELONA - Barcelona

La Revista de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) está indexada en la base de datos Latindex y en la base de datos ICYT, de ciencia y tecnología, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España y ha sido aceptada para su inclusión en Índice Médico Español (IME), la base de datos de Biomedicina del CSIC.

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR

C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º, 6ª

28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94

www.asebir.com · asebir@asebir.com

DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

GÓBALO: Gráfica · Web · Multimedia · Consultoría

C/ Castillo de Fuensaldaña 4, Oficina 213

28232 · Las Rozas · Madrid

Tfno - Fax.: 91 626 39 74

www.gobalo.es · info@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

Soporte válido: 78-R-CM

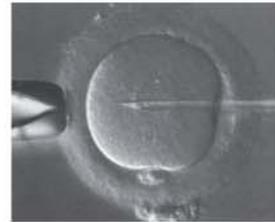
Imágenes de la portada: Configuración normal del complejo huso meiótico-placa metafásica en ovocitos humanos (Imagen superior) y configuración anormal (Imagen izquierda). Cortesía de Duque et al. pp:14-17.

CONTROLTECNICA

instruments

www.controltecnica.com

Incubadores CO₂, Cabinas de flujo laminar, Centrífugas, Autoclaves, Balanzas, Agitadores, Mobiliario técnico de laboratorio



Instrumentación científica para ciencias de la vida



Controltecnica Instrumentación Científica S.L

C/ Artesanos, 7 (Prado del espino) 28660 Boadilla · Tel. 91 728 08 10

E-mail: lab@controltecnica.com

RECONOCIMIENTO DE LA EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Han pasado ya más de 30 años desde el nacimiento de Louise Brown. Desde aquellos días hasta hoy, la Reproducción Humana Asistida, sobre todo la Embriología Clínica, ha experimentado enormes cambios. Han surgido nuevas alternativas, y otras se han visto muy modificadas; y lo mejor de todo es que el cambio, la evolución, continúa.

La reproducción humana asistida y, sobre todo, aquello que nos ocupa: la Embriología, ha terminado ocupando un campo de características propias y bien definidas dentro del panorama sanitario. Resulta difícil pensar que algún gestor de sanidad de las diferentes autonomías pueda dudar de que esta atención sanitaria deba estar incluida en su cartera de servicios.

Muchos son los cambios que han consolidado un campo propio y específico para la Embriología Clínica. Tan sólo por enumerar algunos:

- Aparición constante de alternativas terapéuticas específicas.
- Desarrollo de diferentes técnicas de diagnóstico. Tanto propias como traídas de otros tipos de laboratorios.
- Consolidación de la gestión del laboratorio de reproducción humana asistida, con características diferenciales del resto de laboratorios.
- Implantación de la reproducción humana asistida en la cartera de servicios habitual del sistema sanitario Español
- Posibilidades docentes propias y de formación práctica, cada vez más asequibles.
- Desarrollo de investigación propia, junto con una gran cantidad de alternativas de intercomunicación científica.
- Existencia de diversas asociaciones científicas exclusivas de este campo.
- Desarrollo legislativo específico de forma habitual, no sólo a nivel nacional
- Un impacto incuestionable en la sociedad: natalidad, partos múltiples, preservación de la fertilidad, parejas homosexuales... La reproducción humana asistida ha pasado al espectro de lo habitual.

A pesar de todo esto, hay una parcela esencial que se continúa dejando de lado: el reconocimiento específico, propio y oficial de un ejercicio profesional, el de la Embriología Clínica. Consecuencia de este paso sería la definición de responsabilidades y funciones, y por tanto la planificación de esquemas formativos. No cabe duda alguna, el principal beneficiario de tal reconocimiento sería el propio paciente, tanto por la seguridad como por la calidad asistencial que recibiría.

A muchos nos cuesta pensar qué razones llevan a los responsables del Estado a mantener en una situación de casi parada un reconocimiento que parece tan lógico a los profesionales cercanos a la reproducción humana asistida. Sin embargo, por nuestra parte sí que ha habido un esfuerzo continuado. Podemos hacer un breve resumen.

Uno de los primeros pasos fue la Cualificación de Especialista en Reproducción Asistida Humana, emitida durante un breve periodo de tiempo por el COB. Tras el escaso éxito de ésta, y pasado algún tiempo, surgió la posibilidad de que al profesional del Laboratorio de Reproducción Humana Asistida se le reconociera una de las especialidades reguladas en el RD 1163/2002, que afectaba a biólogos, químicos y bioquímicos. La solicitada mayoritariamente fue la de Análisis Clínicos. La respuesta oficial la conocemos todos, un rotundo NO. De esta respuesta hubo dos consecuencias claras:

- Nosotros aprendimos que NO éramos asimilables como parte de una especialidad previa. Por tanto, sin lugar a dudas, el reconocimiento pasaba por algo más exclusivo y específico.
- El ministerio no podía seguir mirando hacia otro lado durante más tiempo. Era demasiado obvio, tenía una enorme cantidad de expedientes denegados encima de la mesa y todos tenían algo en común, trabajaban en reproducción humana asistida.

Tras esto, empezamos diferentes reuniones con el ministerio. Una de las primeras cosas que quedaron bien claras era la imposibilidad, por el momento, de una especialidad propia. Máxime cuando la intención es disminuir el número de las que hay. Una opción ofrecida fue la posibilidad de valorar el formar parte de las ramas, troncalidades, que pasarán a formar parte de un tronco común, el del Laboratorio Clínico. Tal y como pasará con las hasta ahora existentes de forma individual: Análisis Clínico, Bioquímica Clínica... Esta opción fue trabajada, y se presentó a la correspondiente Dirección General del Ministerio de Sanidad una propuesta de programa formativo de troncalidad en Embriología Clínica. Ésta la podéis obtener en la Web de ASEBIR.

Si bien actualmente las troncalidades no se han ultimado, parece complejo que se vayan a incluir más campos del conocimiento que los ya aceptados como especialidad, aunque seguimos trabajando en ello con el ministerio y con las comunidades autónomas, intentando hacer llegar el asunto al Consejo Interterritorial. Pero el ministerio nos propone una vía alternativa que ayudaría a fundamentar pasos ulteriores, un Certificado en Embriología Clínica que fuera valorado y emitido por ASEBIR; máxime cuando es conocedor del proceso de certificación de la ESHRE.

Sin olvidar el resto de los caminos abiertos, la vía principal de evolución por la que se ha optado, y prácticamente la única que el ministerio deja como viable a corto-medio plazo, es este certificado. Sabemos que su relevancia dependerá de qué apoyos o reconocimientos oficiales pueda llegar a tener, así como de la consideración personal que se le otorgue. Por el momento, la Dirección General de Ordenación profesional, Cohesión del SNS y Alta Inspección del Ministerio de Sanidad y Política Social ha dado un visto bueno a un esquema de Certificación en Embriología Clínica de ASEBIR. Éste tiene varias fases, y en la actualidad se está procediendo a su desarrollo y puesta en marcha, tal y como se está informando a los socios.

La apuesta es arriesgada, sobre todo cuando la incertidumbre de saber a qué puerto nos hará llegar es grande. Pero el mensaje es claro, si algo podemos decir en el presente, es que la Embriología Clínica ha madurado lo suficiente como para reclamar un lugar propio.

Carmen Ochoa, Antonio González, Josep Santaló y Manuel Ardoy
Comisión para la Especialidad de Embriología Clínica.

MediCult es una empresa especializada en el desarrollo y fabricación de medios de cultivo para Técnicas de Reproducción Asistida. Ofrece productos y medios para la recuperación de ovocitos, tratamiento del esperma, cultivo de embriones, criopreservación y Maduración In Vitro de ovocitos.

MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.



MediCult España S.L.

Gran Via Corts Catalanes 184, 7 · 08038 Barcelona · Spain

Tel.: +34 93 394 53 91 · Fax: +34 93 394 53 80

www.medicult.com



MediCult

Innovation with Care

PROTEÓMICA DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

Rafael Oliva Virgili¹, Josep Maria Estanyol², Sara de Mateo López¹, Judit Castillo Corullón¹, José Luis Ballecà Lagarda³

¹Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, y Laboratorio de Genética Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

²Unitat de Proteòmica, Serveis de Suport a la Recerca, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona

³Institut Clínic de Ginecologia Obstetricia i Ginecologia, Hospital Universitari Clínic de Barcelona

e-mail: roliva@ub.edu

Fecha recepció: 16 abril 2010

Fecha aceptació: 18 abril 2010

LA TRANSICIÓN NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA Y ORGANIZACIÓN DEL DNA EN EL NÚCLEO DEL ESPERMATOZOIDE

La espermatogénesis es uno de los procesos que conlleva cambios más radicales en la estructura de la cromatina hasta dar lugar al espermatozoide maduro (Mezquita, 1985; Oliva and Dixon, 1991). De forma progresiva primero se desensambla la estructura nucleosómica presente en las espermatogonias, espermatocitos y espermátidas redondas, y es reemplazada transitoriamente por las proteínas de transición y por último por las protaminas (Mezquita, 1985; Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006; Balhorn, 2007) (Fig. 1).

Mientras que la mayor parte del genoma de espermatozoide (alrededor de 85-95%) está fuertemente empaquetado en forma de estructuras toroidales, también es importante tener en cuenta que alrededor del 5-15% del DNA de los espermatozoides está organizado por proteínas histonas, muchas de las cuales son variantes específicas del espermatozoide (Fig. 1) (Gatewood et al., 1987; Oliva, 2006; Balhorn, 2007). Se ha propuesto que las estructuras toroidales de la nucleoprotamina, cada una con aproximadamente 50 kb de ADN, podrían estar ancladas a la matriz nuclear a través del DNA entre toroide y toroide (Shaman et al., 2007). Actualmente se sabe que la distribución de los genes en las regiones genómicas

organizados por protamina y en las regiones genómicas organizadas por las histonas no es al azar. Estudios recientes basados en el análisis del genoma paterno asociado a cada uno de estos dominios mediante microarrays, han permitido llegar a la conclusión básica de que las regiones asociadas a nucleohistona se hallan asociadas con las regiones reguladoras de genes, lo que implica la existencia de marcas epigenéticas con una función potencial en el desarrollo embrionario (Arpanahi et al., 2009). En otro estudio reciente, basado en secuenciación genómica masiva, se ha detectado que las regiones asociadas a nucleosomas están significativamente enriquecidas en los genes importantes para el desarrollo, incluidos los genes imprintados, los microRNAs, los genes Hox, y los promotores de la transcripción de genes del desarrollo y de factores de señalización (Hammoud et al., 2009). Además, se ha demostrado que las modificaciones de histonas (H3K4me2, H3K27me3) se localizan en determinados loci correspondientes con genes del desarrollo, y que los promotores asociados a genes del desarrollo se hallan hipometilados en el espermatozoide, pero son metilados durante la maduración (Hammoud et al., 2009).

Además de estas marcas epigenéticas determinadas por la distribución diferencial de los genes en los dominios asociados a la nucleohistona y a la nucleoprotamina, hay otros tipos de información epigenética potencialmente transmitida por el núcleo del espermatozoide. Una de las más conocidas y contrastadas es la metilación del DNA (Reik et al., 2001). Más recientemente, la identificación de los RNAs presentes en el espermatozoide

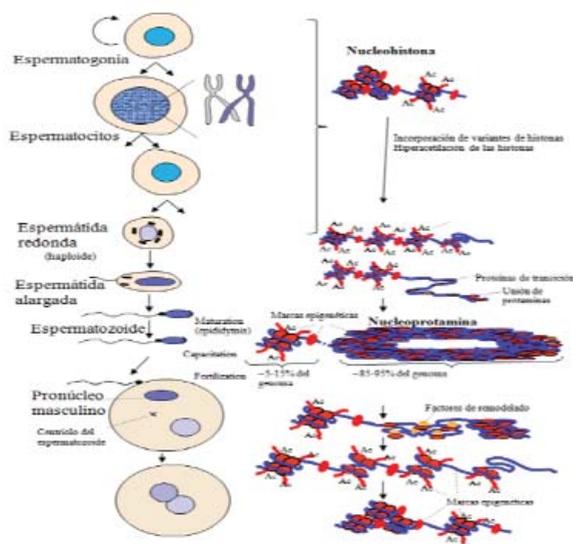


Fig. 1

Figura 1. Representación esquemática de los cambios de la cromatina que ocurren durante la espermatogénesis. El lado izquierdo de la figura representa los cambios celulares durante la espermatogénesis y primeras fases del desarrollo embrionario. El lado derecho de esta figura representa los cambios de la cromatina que tienen lugar durante la transición nucleohistona a nucleoprotamina en la espermiogénesis y en las fases iniciales del desarrollo embrionario. Los cambios celulares en el lado izquierdo de esta figura corresponden aproximadamente a las estructuras de la cromatina y actividades indicadas en el lado derecho. Las histonas están representadas en color rojo y el DNA se marca como líneas azules. Basado en Oliva et al. (2009) con modificaciones.

y la demostración de su transferencia al oocito abren la posibilidad de un papel de éstos en la fecundación (Ostenmeyer et al., 2004). Otra fuente de información epigenética potencial podría ser la presencia de otras proteínas en el núcleo del espermatozoide, además de las histonas y de las protaminas (Oliva et al., 2009).

La primera evidencia de la presencia de proteínas en el espermatozoide que podían resultar cruciales para el desarrollo del embrión fue el hallazgo de que en los seres humanos y en la mayoría de los mamíferos (con la excepción del ratón), el centrosoma se hereda de forma paterna (Chatzimeletiou et al., 2008). También se ha demostrado que variantes de histonas presentes en el espermatozoide contribuyen a la formación de la cromatina cigótica en humanos y que los procesos epigenéticos, implementados durante la espermatogénesis, permiten distinguir el pronúcleo paterno en el embrión (van der Heijden et al., 2008; de Mateo et al., 2010). Diversas proteínas adicionales presentes en los espermatozoides podrían estar también relacionadas con el desarrollo embrionario (Martínez-Heredia et al., 2006; de Mateo et al., 2007).

Más recientemente, el análisis proteómico de las proteínas identificadas en los espermatozoides maduros ha proporcionado algunos resultados inesperados. Por ejemplo, hay factores de transcripción, proteínas de unión al DNA y proteínas implicadas en el metabolismo de la cromatina en células que son transcripcionalmente inactivas (Oliva et al., 2008; 2009). Los catálogos correspondientes a los proteomas de espermatozoide humano ya están disponibles (Martínez-Heredia et al., 2006; Baker et al., 2007; Oliva et al., 2009). Es notable la presencia de proteínas como la histona acetiltransferasa y deacetilasa, histona metiltransferasa, metiltransferasa del ADN, la topoisomerasa, helicasa, factores de transcripción, zinc fingers, proteínas homeobox, proteínas cromodominio, proteínas centrosómicas, y la telomerasa en las células que son transcripcionalmente inertes y que tienen al menos el 85% de su DNA empaquetado por protaminas (Oliva et

al., 2008; 2009). Una cuestión crucial es si estos factores de transcripción y las proteínas recientemente identificados en los núcleos representan vestigios del proceso de la espermatogénesis o bien están marcando algunas regiones del genoma paterno y poseen una función epigenética (Oliva et al., 2008; 2009; Rousseaux et al., 2008).

Anomalías en el contenido de protamina en pacientes subfértiles fueron ya descritas hace más de 20 años (Balhorn et al., 1988). Posteriormente, otros estudios confirmaron la relación entre un contenido anormal de protaminas y alteraciones en los parámetros seminales en estos pacientes infértiles (de Yebra et al., 1993; Mengual et al., 2003; Aoki et al., 2005). Una de las causas potenciales de alteraciones en la relación de protaminas (P1/P2) puede encontrarse en un procesamiento anormal de protamina 2 e incremento de

los precursores de protamina en un subconjunto de los pacientes (de Yebra et al., 1998; Bench et al., 1998). Además de estos estudios en pacientes subfértiles, la expresión de protaminas también se ha estudiado en respuesta al estrés térmico y se ha descrito que episodios de fiebre alta se correlacionan con la aparición de precursores de protamina P2 y con un aumento en la proporción de las histonas entre los 33 y 39 días después de la hipertermia (Evenson et al., 2000).

Los resultados del contenido de protaminas y de histonas se han correlacionado con alteraciones en la integridad del DNA y con los resultados de reproducción asistida (Bizarro et al., 1998; Nasr-Esfahani et al., 2005; Aoki et al., 2006; Torregrosa et al., 2006; Domínguez-Fandos et al., 2007; de Mateo et al., 2008; Aitken and de Yulius et al., 2010).

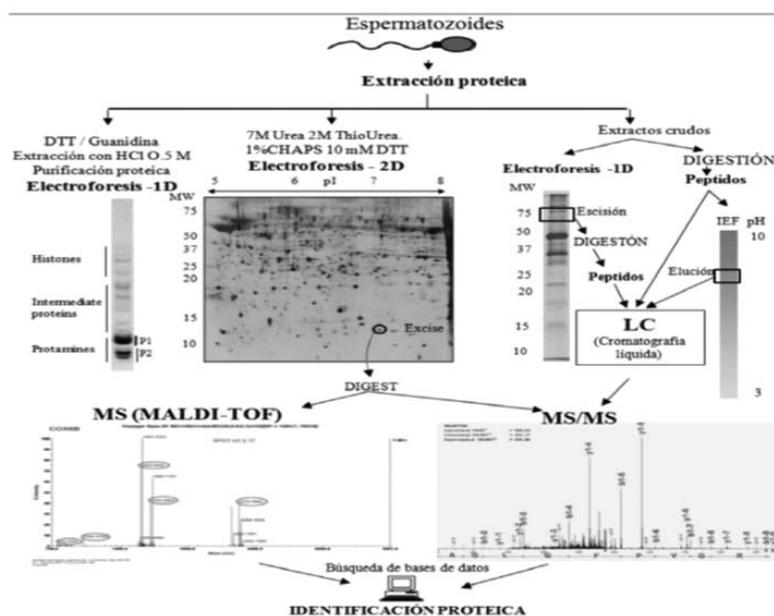


Fig. 2

Figura 2. Estrategias disponibles para el estudio del proteoma del espermatozoide.

La extracción típica de protaminas a partir de espermatozoides consiste en la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas con ditionitrito (DTT) / hidrocloreto de guanidina, seguida de la extracción con 0,5 M HCl, precipitación y purificación de las proteínas y su separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida ácido (izquierda). Con esta estrategia es posible visualizar las proteínas nucleares mayoritarias: una banda proteica prominente correspondiente a la protamina 1 (P1) y un conjunto de bandas correspondiente a la familia de la protamina 2 (P2). Para analizar el proteoma total es posible recurrir a la electroforesis bidimensional de las proteínas del espermatozoide. Para ello se suele recurrir a una primera dimensión a través de isoelectroenfoque, separando las proteínas atendiendo a su punto isoeléctrico (pI), seguido de una segunda dimensión a través de electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS, que separa a las proteínas por su peso molecular aparente. La identificación de las proteínas se realiza entonces a través de espectrometría de masas. Una última estrategia mucho más robusta consiste en la generación inicial de péptidos, seguida de su separación mediante cromatografía líquida e identificación mediante espectrometría de masas (derecha). Basado en Oliva et al. (2009) con modificaciones.

Identificación de proteínas del espermatozoide y de sus alteraciones a través de técnicas proteómicas.

Esencialmente se han utilizado dos alternativas diferentes para el estudio proteómico de los espermatozoides a través de espectrometría de masas (MS): 1) electroforesis bidimensional (2D) seguida de la identificación por MALDI-MS o cromatografía líquida LC-MS/MS, y 2) la digestión inicial de proteínas para generar péptidos, seguido por su separación y análisis LC-MS/MS (Oliva et al., 2009; Baker and Aitken et al., 2009). La primera alternativa implica generalmente la separación de las proteínas utilizando isoelectroenfoque y es seguida por una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) para separar las proteínas en una segunda dimensión en función de su peso molecular (Fig. 2).

Esta alternativa ha sido ampliamente utilizada en el pasado, permitiendo identificar muchas proteínas presentes en el espermatozoide (Com et al., 2003; Pixton et al., 2004; Martínez-Heredia et al., 2006; 2009). Pero de las dos alternativas, la capacidad de análisis de la generación inicial de péptidos y su análisis mediante LC-MS/MS es muy superior. Por ejemplo, a través de 2D y MALDI-TOF o LC-MS/MS es posible identificar hasta unos pocos cientos de proteínas (de Mateo et al., 2007; Martínez-Heredia et al., 2008), mientras que con la generación inicial de péptidos seguido de LC-MS/MS es posible llegar a identificar hasta alrededor de 1000 proteínas diferentes (Baker et al., 2007; Oliva et al., 2009).

Actualmente el catálogo más amplio de las proteínas presentes en el espermatozoide humano se ha conseguido a través de LC-MS/MS con 1056 productos génicos identificados y es complementario al obtenido mediante 2D e identificación de las proteínas (de Mateo et al., 2007; Baker et al., 2007; Oliva et al., 2009). Además de la generación de catálogos de las proteínas, la proteómica se ha aplicado también a la identificación de la presencia de anomalías en pacientes estériles. Existen diversas estrategias para analizar el contenido diferencial de proteínas presentes en dos o más

muestras distintas. Un método es el 2D-DIGE que se basa en el marcado diferencial utilizando fluorocromos de las proteínas extraídas del control (por ejemplo con verde) y de las células experimentales (por ejemplo con rojo). Esto es seguido de su mezcla y separación en la misma 2D, lo que permite detectar las proteínas aumentadas o disminuidas observando la desviación de la fluorescencia hacia uno de los fluorocromos (Baker et al., 2005; Oliva et al., 2008). Otra alternativa es la cuantificación y comparación de la abundancia relativa de las distintas proteínas en geles independientes. Estrategias más recientes desarrolladas se basan en el marcado isotópico no radioactivo de las muestras problema y control (Baker et al., 2009; Oliva et al., 2009).

La primera descripción del potencial de análisis proteómico 2D en el estudio de defectos en espermatozoides se realizó en un paciente con un fallo reiterado de fecundación en técnicas de fecundación in vitro (Pixton et al., 2004). El proteoma de este paciente mostró 20 diferencias en comparación con los controles y se consiguió identificar varias proteínas diferenciales. Posteriormente se ha conseguido identificar proteínas diferenciales en pacientes astenozoospermicos, oligozoospermicos y en pacientes con alteraciones en el contenido de protaminas o en la integridad del DNA (Baker et al., 2005; de Mateo et al., 2007; Oliva, 2007; Martínez-Heredia et al., 2009; Botta et al., 2009; Siva et al., 2010). La proteómica se ha aplicado también al estudio de los antígenos inmunogénicos presentes en los espermatozoides, tanto con el fin de comprender la esterilidad inmunológica como para identificar posibles candidatos inmuno-anticonceptivos (Oliva et al., 2009).

La aplicación de las técnicas de proteómica en andrología y en biología reproductiva se halla en sus inicios, pero los datos disponibles hasta la fecha ya indican su enorme potencial. Es previsible que en un futuro permitan una disección molecular de las distintas causas de esterilidad masculina, permitiendo tanto la identificación de los mecanismos fisiopatogénicos

implicados, como resultar de utilidad en el diagnóstico, pronóstico, y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Subvencionado en parte gracias al proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFU2009-07118), Fondos FEDER a R.O.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken RJ, De Iulius GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:3-13.

Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl.* 2006;27:890-898.

Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod.* 2005;20:1298-1306.

Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, et al. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 2009;19:1338-1349.

Baker MA, Aitken, RJ. Proteomic insights into spermatozoa: critiques, comments and concerns. *Expert Rev Proteom.* 2009; 6:691-705.

Baker MA, Reeves G, Hetherington L, Muller J, Baur I, Aitken RJ. Identification of gene products present in Triton X-100 soluble and insoluble fractions of human spermatozoa lysates using LC-MS/MS analysis. *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1:524-532.

Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2005; 5:1003-1012.

Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia.* 1988; 44:52-55.

Balhorn R. The protamine family of sperm

- nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007; 8:227.
- Bench G, Corzett MH, De Yebra L, Oliva R, Balhorn R. Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. *Mol Reprod Dev.* 1998; 50:345-353.
- Bizarro D, Manicardi GC, Bianchi PG, Bianchi U, Mariethoz E, Sakkas D. In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:127-132.
- Botta T, Blescia S, Martínez J, Lafuente R, Brassesco M, Ballescà JL y Oliva R. Identificación de diferencias proteómicas en muestras oligozoospermicas. *Rev Int Androl.* 2009; 7:14-9.
- Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, Prapas Y, Handyside AH. The centrosome and early embryogenesis: clinical insights. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16:485-491.
- Com E, Evrard B, Roepstorff P, Aubry F, Pineau C. New insights into the rat spermatogonial proteome: identification of 156 additional proteins. *Mol Cell Proteom.* 2003; 2:248-261.
- de Mateo S, Gazquez C, Guimera M, et al. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 2009; 91:715-22.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, et al. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics.* 2007; 7:4264-4277.
- de Yebra L, Ballescà JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem.* 1993; 268:10553-10557.
- de Yebra L, Ballescà JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril.* 1998; 69:755-759.
- Dominguez-Fandos D, Camejo MI, Ballescà JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A.* 2007; 71:1011-1018.
- 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; 21:739-746.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science.* 1987; 236:962-964.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* 2009; 460(7254):473-478.
- Martinez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Hum Reprod.* 2009; 23:783-791.
- Martinez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics.* 2006; 6:4356-4369.
- Mengual L, Ballescà JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl.* 2003; 24:438-447.
- Mezquita C. Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. *Revis Biol Celular.* 1985; 5:V-XIV, 1-124.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11:198-205.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 2006; 12:417-435.
- Oliva R. Infertilidad de causa genética. *Revista ASEBIR* 2007; 12(2):93-103.
- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991; 40:25-94.
- Oliva R, Martínez-Heredia J, de Mateo S, Gázquez C, Oriola J, Estanyol JM, Guimera M, Balasch J, Ballescà JL. Proteomics of human spermatozoa, protamine content and assisted reproduction outcome. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 65:527-30.
- Oliva R, Martínez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med.* 2008; 54:23-36.
- Oliva R, de Mateo S, Estanyol JM. Sperm cell proteomics. *Proteomics.* 2009; 9:1004-1017.
- Oliva R, de Mateo S, Ballescà JL (2009) Proteomics in Andrology. In: Papers contributed to the 9th International Congress of Andrology (Ballescà JL, Oliva R, Eds.), Medimond International Proceedings. Bologna. Pp 60-69.
- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature.* 2004; 429:154.
- Pixton KL, Deeks ED, Fleisch FM, Moseley FL, Bjorndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. *Hum Reprod.* 2004; 19:1438-1r447.
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001; 293:1089-1093.
- Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16:492-503.
- Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl.* 2007; 53:135-140.
- Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, Deendayal M, Shivaji S. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *Mol Hum Reprod.* 2010; Mar 18. [Epub ahead of print].
- Torregrosa N, Dominguez-Fandos D, Camejo MI, et al. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod.* 2006; 21:2084-2089.
- van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol.* 2008; 8:34.

METABOLÓMICA Y REPRODUCCIÓN HUMANA

Imma Sánchez Ribas^{1,2}, Francisco Domínguez², Carlos Simon³.

¹IVI Barcelona, Fundación IVI, Embryomics, ²Embryomics, ³ IVI Valencia, Fundación IVI

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores retos en el campo de la reproducción humana es la selección de los embriones más apropiados a transferir. Hasta la fecha, en los ciclos de Fecundación In Vitro, la evaluación morfológica sigue siendo el método de asesoramiento utilizado para escoger el mejor embrión o blastocisto, pero este método de selección es altamente subjetivo y su modesto poder predictivo y la variabilidad inter- e intra-observador limita su valor.

Además, seleccionar el mejor embrión a transferir no sólo significa escoger el embrión que nos va a dar más posibilidades de embarazo, sino que también es crucial escoger aquel embrión que nos va a aumentar la tasa de recién nacido vivo en casa.

Actualmente, lo más novedoso en el estudio de la embriogénesis son las técnicas -Ómicas. Son disciplinas que estudian los eventos e interacciones de las estructuras celulares y sus procesos, desde el DNA hasta la función biológica; es decir, desde los genes hasta los metabolitos. Todos los procesos que contribuyen en el

análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas y metabolitos, respectivamente, en una célula, un organismo o una muestra bajo distintas condiciones, con la finalidad de obtener un perfil comprensible de todas las proteínas y metabolitos de esa célula, organismo o muestra. Los metabolitos de bajo peso molecular representan el producto final de procesos de regulación celular, y por lo tanto revela la respuesta de los sistemas biológicos a una variedad de influencias genéticas, nutricionales y ambientales (Singh and Sinclair, 2007)

Aunque la metabolómica es obviamente complementaria a la genómica y proteómica, tiene ventajas especiales. La tabla número 1 recoge las ventajas del estudio del metaboloma en comparación con el del transcriptoma y el proteoma (Dunn and Ellis, 2003).

CAMBIO EN LAS ESTRATEGIAS DE GENERACION DE HIPÓTESIS

Las -Ómicas están transformando el método de investigación. El obtener tal grado de información ha implicado un cambio en el ciclo del conocimiento. En el ciclo del conocimiento tradicional, el

Sin embargo, con las -Ómicas tenemos una situación de acercamiento inductivo, donde no hay una hipótesis real, y la estrategia es generar esta hipótesis desde los datos obtenidos, provocando un descubrimiento del conocimiento y pudiendo a posteriori testar estas nuevas hipótesis de la forma tradicional. El diseño experimental es muy importante en el acercamiento inductivo, porque determinará qué experimentos nos van a dar la información que estamos buscando. La estrategia en la que un algoritmo elige qué experimentos hacer es conocida como "aprendizaje activo" y es la estrategia de elección. Para ello debemos contar con sistemas informáticos de alta complejidad (Waidyanathan, 2003; Goodacre, 2004)

¿QUÉ ES LA METABOLÓMICA?

Existe un debate activo en la comunidad científica sobre la definición exacta de metaboloma. Fue definido por primera vez por Oliver y cols. (1988) como el complemento cuantitativo de todas las moléculas de bajo peso molecular que se encuentran en las células en un estado fisiológico particular o de desarrollo. Otra definición sustenta que el metaboloma consiste en sólo aquellas moléculas pequeñas y nativas que están participando en reacciones metabólicas generales y que son requeridas para el mantenimiento, crecimiento y funcionamiento de la célula (Beecher et al., 2003).

En términos generales, por metabolómica (Nicholson et al., 1999; Fiehn et al., 2002) se entiende la obtención, de una manera simultánea y global, de perfiles correspondientes a múltiples concentraciones de metabolitos y de sus fluctuaciones sistémicas y celulares en respuesta a fármacos, dieta, genética, estilo de vida, entorno y estímulos, de forma que sea posible caracterizar los efectos adversos y beneficiosos de esas interacciones.

La metabolómica busca una descripción analítica de muestras biológicas

Tabla 1. Ventajas del análisis metabolómico

- En una célula el número de metabolitos obtenido es menor que el número de genes y proteínas. La complejidad de la muestra es menor.
- La teoría del análisis de control metabólico (Kell et al., 1999) y los trabajos experimentales han demostrado que aunque la concentración de una enzima y flujos metabólicos no cambien significativamente durante una reacción bioquímica, la concentración de metabolitos puede cambiar significativamente.
- El metaboloma es el producto final de la expresión génica, por tanto refleja el nivel funcional de una célula más apropiadamente y se espera que cambios en el metaboloma sean amplificados en comparación al proteoma o transcriptoma (Urbanczik-Wochniak et al., 2003).
- La investigación está demostrando que los flujos metabólicos no sólo están regulados por la expresión génica sino que también están por el estrés ambiental y por lo tanto la medición de los productos finales (metabolitos) es más apropiada (Johnson H.E. et al. 2003).

fenotipo pasan a través de este complejo sistema, y la Genómica, Transcriptómica, Proteómica y Metabolómica intentan comprender cómo un embrión crece y cuáles son sus indicadores de éxito.

Las tecnologías proteómica y metabolómica han desarrollado el

conocimiento previo se utilizaba para construir una hipótesis para ser testada experimentalmente. El experimento producía datos que daban consistencia o no a la hipótesis inicial. Es decir, la hipótesis era el punto de partida. El acercamiento, por tanto, era hipotético-deductivo.

complejas, e intenta caracterizar y cuantificar todas las moléculas pequeñas de ese tipo de muestras. Sin embargo, medir el metaboloma es un reto analítico considerable. Esto es debido a la naturaleza lábil de los metabolitos, el rango ampliamente dinámico y diverso de muchos de ellos, la complejidad química y heterogénea de los mismos, la falta de técnicas analíticas automatizadas que puedan medir cuantitativamente un gran número de metabolitos de estructura desconocida, el rendimiento de las mediciones y la naturaleza elaborada de los protocolos de extracción (Whitfield et al., 2004).

PLATAFORMAS DE ANÁLISIS

Todos estos desafíos deben ser abordados por la plataforma de análisis empleados. Las plataformas para las medidas del metaboloma deben ser imparciales, sensibles y con una gran capacidad de análisis de alto rendimiento para discriminar un gran número de metabolitos. A pesar del gran éxito en el desarrollo de la tecnología

De todas ellas, las tecnologías más empleadas para el análisis metabolómico son la espectrometría de masas, que generalmente incluye un paso de separación cromatográfica, y la espectroscopia de RMN, dado que ambas plataformas proporcionan una amplia información estructural y conformacional sobre múltiples clases químicas en un procedimiento analítico único. Las dos técnicas poseen diferentes ventajas y desventajas desde el punto de vista técnico, y suelen ofrecer información complementaria (Lenz et al., 2007). Ambos métodos proporcionan información sobre un amplio conjunto de metabolitos, sin tener que preseleccionar qué analitos deben ser detectados. Esto nos permite diseñar experimentos basados en el razonamiento inductivo para generar nuevas hipótesis, siendo una vía potencial de descubrimiento de conocimiento a través del holismo. Además, los dos métodos pueden emplearse para identificar las estructuras de los metabolitos, y para medir las concentraciones relativas y absolutas.

biológico o clínico y explicar los mecanismos bioquímicos relacionados con los cambios observados, y así ampliar el conocimiento existente.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM O MS) Y RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

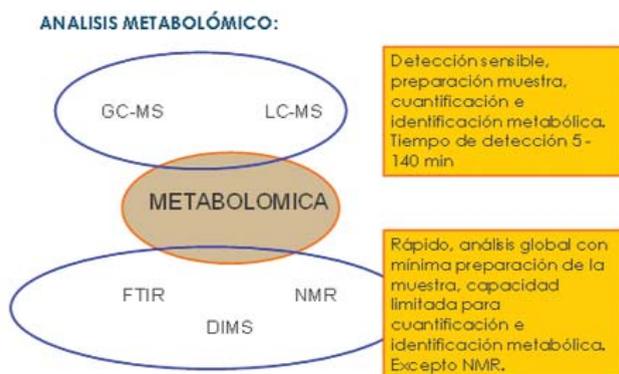
Tanto la EM como la RMN se emplean de forma rutinaria en los estudios metabolómicos.

La EM es una herramienta de análisis metabolómico muy poderosa, ya que provee una única mezcla de sensibilidad, rapidez, calidad y análisis potencialmente cuantitativo de una gran cantidad de metabolitos. Puede ser usada sola o en combinación con otras técnicas de cromatografía. Los análisis de EM requieren una preparación exhaustiva de la muestra y una extracción de la misma utilizando solventes orgánicos que pueden provocar la pérdida de algunos compuestos.

La RMN es una técnica no destructiva, no invasiva, y que no modifica el equilibrio biológico, y proporciona una información detallada sobre las estructuras moleculares en solución. Además la espectroscopia de RMN es una técnica muy fiable para las aplicaciones metabolómicas que requieren un alto grado de reproducibilidad.

Ambas técnicas permiten la detección simultánea de un amplio rango de metabolitos estructuralmente diversos y la detección en bajas concentraciones de los mismos.

Fig 1.



metabolómica, aún no es posible analizar con una única plataforma analítica la diversidad de metabolitos complejos. La Fig. 1 indica las distintas tecnologías para el análisis metabolómico de muestras, así como las características más relevantes de las mismas. El tipo de muestras que se analiza mediante estas técnicas son biofluidos como orina, plasma o suero previa precipitación de proteínas; metabolitos intracelulares de plantas, microbios y animales, previa extracción mediante solventes polares y no polares; tejidos sin previa o mínima preparación y huellas metabólicas en secreciones naturales de metabolitos intracelulares hacia el volumen extracelular.

OBJETIVOS DE LA METABOLÓMICA

Todos los estudios metabolómicos dan lugar a un conjunto de resultados complejo, que requiere un software específico para su visualización y métodos quimiométricos y bioinformáticos para su interpretación. El objetivo de estos experimentos es generalmente el de obtener huellas bioquímicas que puedan ser útiles desde un punto de vista diagnóstico o de clasificación, y, en un segundo lugar, el de identificar las sustancias que contribuyen a dicho diagnóstico o clasificación, ya que éstas conforman un conjunto complejo de biomarcadores que puede ayudar a definir el contexto

Es importante tener en cuenta que, sea cual sea el origen de las muestras, deben evitarse fuentes potenciales de artefactos durante el proceso de recogida de las muestras biológicas, con el fin de obtener resultados que posean una buena calidad y fiabilidad.

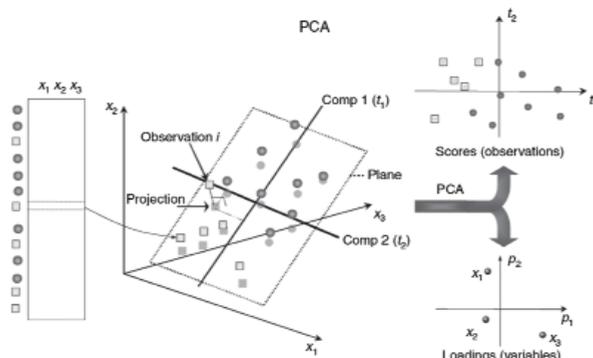
Análisis estadístico multivariable

Los métodos de análisis estadístico multivariable proporcionan un medio de optimizar la extracción de la información contenida en los espectros de EM y RMN de mezclas complejas. Una vez realizados todos los pasos anteriores, lo que se tiene es una serie (uno por muestra) de perfiles multivariable que representan un punto

en un espacio K-dimensional, y cuya posición (coordenadas) depende de los valores de cada uno de los descriptores (o metabolitos) que describen el sistema (la muestra). Cuando se trata de analizar una serie de perfiles, resulta muy útil la aplicación de lo que se denominan métodos basados en la proyección. Los métodos de proyección convierten tablas de datos multidimensionales en modelos de dimensionalidad. Esto permite detectar además agrupaciones y tendencias, ya que puntos que se encuentran cercanos corresponden a perfiles multivariados relativamente similares. De forma opuesta, puntos que se encuentran alejados unos de otros presentan descriptores muy diferentes.

Un ejemplo de lo explicado podemos verlo en la Figura 2, donde puede apreciarse la

Fig 2.



utilidad de esta herramienta para comprender los patrones que subyacen bajo la gran cantidad de información generada en los estudios metabolómicos. Quedan patentes las relaciones entre las distintas muestras, pudiendo describir agrupamientos, tendencias e influencias.

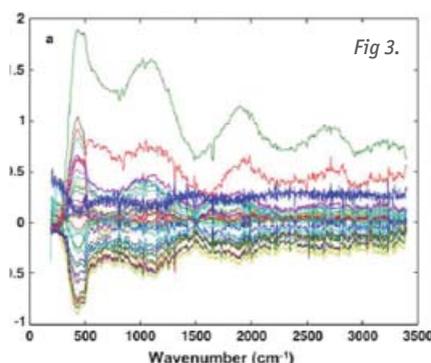
Aunque los métodos de proyección descritos forman la base de los estudios metabolómicos, los análisis estadísticos dependen del tipo de estudio que se esté desarrollando. Existe una gran variedad de métodos que pueden emplearse en el análisis de datos metabolómicos. La principal diferencia entre todos ellos es si se dispone o no de información previa sobre la clasificación de muestras en clases distintas, o si se sospecha la existencia de nuevas clases. Sin duda alguna, los métodos más empleados de análisis multivariable son los denominados PCA (análisis de componentes principales (Holmes, 1998)) y PLS (mínimos cuadrados parciales (Wold et al., 1984)). El PCA es un método no supervisado que se

emplea para revelar la estructura interna de un conjunto de datos sin que medie ningún tipo de conocimiento previo del sistema. PLS, sin embargo, es un método supervisado para regresión. En este caso, el objetivo es predecir las respuestas en un conjunto de datos. Empleando una barrera de corte, PLS puede emplearse también para análisis basados en la clasificación y discriminación (PLS-DA, "Partial Least Squares-Discriminant Analysis").

Identificación de metabolitos

Dependiendo del tipo de análisis que se esté desarrollando, los estudios metabolómicos pueden requerir la identificación de los metabolitos presentes en las muestras biológicas analizadas. Este objetivo puede

alcanzarse mediante la comparación entre los desplazamientos químicos obtenidos en los espectros de EM o RMN y aquellos disponibles en bases de datos como la MMCD (Madison Metabolomics Consortium Database) (Cui et al., 2008)) o la HMDB (Human Metabolome DataBase) (Wishart et al., 2007). Alternativamente, existen programas (p.ej., "Analysis of MIXtures", AMIX, Bruker BioSpin) que permiten realizar todas las etapas descritas anteriormente (selección de regiones de interés, segmentación del espectro, normalización, análisis estadístico) y que



contienen módulos (B-BioRef-Code, Bruker BioSpin) que permiten la identificación y asignación de metabolitos presentes en mezclas complejas. Hay que tener en cuenta que las bibliotecas metabolómicas no son completas, y que no todos los metabolitos hallados tienen posibilidad de identificación.

ASESORAMIENTO METABOLÓMICO DE CALIDAD EMBRIONARIA

El metabolismo es intrínseco a la salud del embrión, por lo que muchas investigaciones se han concentrado en desarrollar marcadores metabólicos no invasivos de capacidad de desarrollo, como el consumo de oxígeno, reacciones REDOX, el consumo energético a través de Na^+ , K^+ y ATPasa o el turnover de aminoácidos (Houghton et al., 2004).

Las últimas investigaciones en las técnicas moleculares están definiendo perfiles génicos, proteicos y metabolómicos para intentar detectar cuál es el ovocito o embrión más hábil, entendiendo esta habilidad como su capacidad para implantar (Katz-Jaffe et al., 2006; Patricio et al., 2007; Brison et al., 2007; Seli et al., 2007)

Actualmente se están desarrollando técnicas cuantitativas para el asesoramiento no invasivo del metabolismo embrionario, y es el objetivo de investigaciones actuales el determinar su valor como predictores de viabilidad embrionaria y embarazo (Seli et al., 2007).

Seli y col. publicaron en 2007 el primer estudio con un enfoque metabolómico para estudiar la viabilidad del embrión humano. Ellos utilizaron como plataforma metabolómica de análisis el Near-infrared and Raman spectroscopy, para analizar y comparar el perfil metabolómico utilizando medios condicionados provenientes de embriones que implantaron frente a los que no implantaron. Aunque no encontraron marcadores específicos, si obtuvieron distintos espectros entre ambos grupos, siendo posible diferenciar fácilmente ambas poblaciones. La Fig 3 muestra los distintos espectros que obtuvieron de los medios de cultivo embrionario analizados de cada una de las muestras utilizadas en el estudio (Seli et al., 2007).

El mismo grupo, en 2008, publica la identificación de marcadores de viabilidad utilizando análisis metabolómico mediante NMR, en un estudio retrospectivo realizado en 34 pacientes. Explican encontrar diferencias significativas en concentraciones de glutamato entre embriones procedentes de embarazos y/o partos y embriones procedentes de fallo de implantación (Seli et al., 2008).

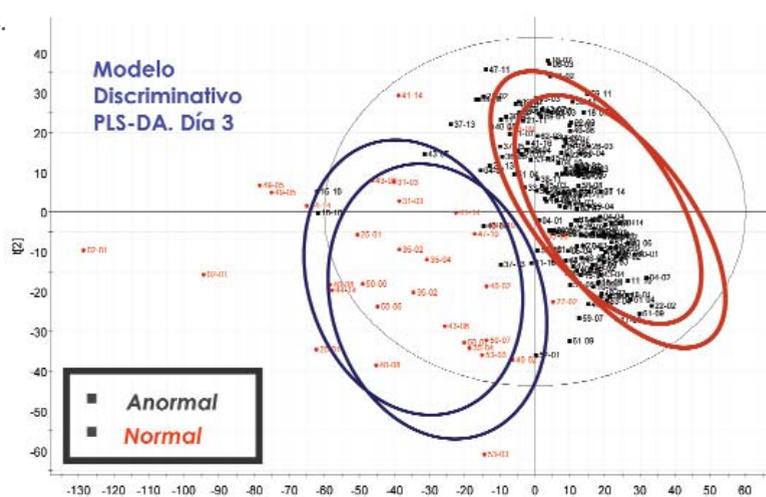
Otra aplicación de la metabolómica en el campo de la Reproducción Humana es el que estamos llevando en el Instituto Valenciano de Infertilidad, con el apoyo de la Fundación IVI. Nuestro objetivo es desarrollar un diagnóstico preimplantacional no invasivo con la ayuda de estas nuevas tecnologías. Pretendemos encontrar un perfil metabolómico embrionario que nos permita discriminar los embriones normales de los embriones aneuploides, utilizando el medio de cultivo donde éstos se desarrollan.

La instrumentación de análisis metabolómico que estamos utilizando es la Espectrometría de Masas asociada a UPLC. El sistema de UPLC ha sido diseñado para detectar partículas pequeñas (1,7 mm) y encontrar así perfiles de alta resolución. Por lo tanto, este sistema es óptimo para el análisis de muestras de alta complejidad, como nuestros medios de cultivo, debido al alto poder de separación metabólica y resolución de picos.

En los análisis llevados a cabo hasta la fecha, hemos observado que el perfil metabólico de los medios de cultivo de los embriones humanos parece discriminar entre embriones cromosómicamente normales y anormales, aunque existen limitaciones debidas a la baja cantidad de metabolitos presentes en las muestras.

La Fig 4 es un score-plot donde cada punto representa un medio de cultivo embrionario, lo que nos permite apreciar la relación que hay entre las muestras. La tendencia observada es que muestras procedentes de embriones diagnosticados normales mediante diagnóstico preimplantacional para screening de aneuploidías (PGD-AS) se concentran en un área del diagrama de coordenadas, y

Fig 4.



muestras procedentes de embriones con diagnóstico de aneuploidías se concentran en un área distinta.

DISCUSIÓN

El método de evaluación tradicional embrionario tiene una capacidad limitada para seleccionar embriones con desarrollo potencial. Hay una clara necesidad de mejora en nuestro trabajo diario; deberíamos ser capaces de aumentar las tasas de gestación y disminuir el riesgo de gestación múltiple. Actualmente existen nuevas tecnologías en desarrollo para conseguir este objetivo, pudiendo ser tecnologías que utilicemos en un futuro como herramientas útiles de selección embrionaria, así como tecnologías que nos permitan expandir el conocimiento de la fisiología embrionaria con el objetivo de aumentar la eficacia de las Técnicas de Reproducción Asistida.

La capacidad de evaluar la producción y consumo metabolómico de un embrión individual nos llevaría a una mejor comprensión de la función celular y fisiología en etapas específicas de la embriogénesis. Por otra parte, este enfoque nos ayudaría a mejorar los medios de cultivo de embriones y podríamos identificar las interacciones entre los embriones y el epitelio uterino materno antes de la implantación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beecher, CWW. The human metabolome. In *metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*, 2003. pp. 311-319.

Brison DR, Hollywood K, Arnesen R, Goodacre

R. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive análisis of the secretome using metabolomic footprinting. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15: 296-302.

Cui Q et al. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 162-164.

Dunn W, Ellis D. Metabolomics : current analytical platforms and methodologies. *Trends in analytical chemistry* 2005; 24: 285-294.

Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48: 155-71.

Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn W, Harrigan G and Kell D. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* 2004; 22: 245-252.

Holmes E, Nicholson J, Nicholls A, Lindon J, Connor S, Polley S, Connelly J. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1998; 44: 245-255.

Houghton F, Leese H. Metabolism and developmental competence of the preimplantational embryo. *Europ Jour of Obst Gyn Reprod Bio* 2004.115S. S92-S96.

Johnson HE, Broadhurst D, Goodacre R, Smith AR. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochemistry* 2003; 62: 919-28.

Katz-Jaffe M, Gardner D, Schoolcraft W. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of

development and viability. *Fertility and Sterility* 2006;1.

Kell D et al. (1999). Technological and medical implications of metabolic control analysis. Kluwer Academic Publishers, London, p3.

Lenz EM, Wilson ID. Analytical Strategies in Metabonomics. *J Proteome Res* 2007; 6: 443-458.

Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living system to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-9.

Oliver SG et al. Systematic functional analysis of de yeast genome. *Trends biotechnol* 1988; 16: 373-378

Patricio P, Fragouli E, Bianchi V, Borini A, Wells D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reproductive BioMedicine Online* 2007; 15: 346-353.

Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns D. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertyl Steril* 2008; 90: 77-83.

Seli E, Sacas D, Scott C, Kwok S, Rosendahl S, Burns D. Non invasive metabolomis profling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potencial of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertyl Steril* 2007; 88: 1350-7.

Seli E, Botros L, Sakkas D, and Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008; 90: 2183-89.

Singh R, Sinclair K. Metabolomics: approche to assessing oocyte and embryo quality, *Theriogenology* 2007, doi:10.1016.

Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig J, Roessner-Tunali U, Willmitzer L, Fernie AR. Parallel analysis of transcript and metabolic profile. *EMBO Rep* 2003; 4: 989-992.

Waidyanathan S. et al. Explanatory optimisation of protein mass spectrometry via genetic search. *Anal.Chem* 2003; 75.

Whitfield PD, German A and Noble P. Metabolomics: and emerging post-genomic tool for nutrition. *British Journal of Nutrition*. 2004; 92: 549-555 .

Wishart DS, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35. D521-D526.

Wold S, et al. The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses *J Sci Stat Comput* 1984; 5: 735-743.

Sistemas Genómicos compañía líder en análisis de ADN

Servicio integral de Genética aplicado a la Medicina

- Experiencia y capacidad tecnológica para el abordaje diagnóstico de cualquier enfermedad de base genética conocida
- Centro de referencia internacional para el diagnóstico de enfermedades genéticas

GENÉTICA MÉDICA

Nuevas herramientas diagnósticas para la mejora de su práctica clínica

CONSEJO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL

ENFERMEDADES RARAS

CÁNCER HEREDITARIO

GENÉTICA ONCOHEMATOLÓGICA

ESTUDIOS GENÉTICOS A MEDIDA

GENÉTICA REPRODUCTIVA

Una manera sencilla de ofrecer DGP a sus pacientes

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Detección de aneuploidias
Determinación del sexo embrionario

Anomalías cromosómicas estructurales
Enfermedades monogénicas
Tipaje HLA

INFERTILIDAD GENÉTICA

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES

CONSEJO GENÉTICO REPRODUCTIVO



sistemas genómicos
BIOMÉDICA

Parque Tecnológico de Valencia
Ronda G. Marconi, 6
46980 PATERNA (Valencia)
Tel. 902 364 669 · Fax 902 364 670
info@sistemasgenomicos.com
www.sistemasgenomicos.com

Solicite nuestro catálogo
902 364 669

EFFECTO DEL PROCESO DE VITRIFICACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA DEL HUSO MEIÓTICO Y ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA EN OVOCITOS HUMANOS EN METAFASE II

EFFECT OF VITRIFICATION PROCEDURE ON SPINDLE AND CHROMOSOME CONFIGURATION IN METAPHASE II HUMAN OOCYTES

Cristina Costana Duque*¹, Javier Alfonso², Rita Cervera³, Ana Monzó^{1,2}, Vicente Montañana^{1,2}, Miodrag Stojkovic³, Alberto Romeu^{1,2}

¹Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología). Hospital Universitario la Fe, Valencia. ²Instituto de Medicina Reproductiva (IMER), Valencia. ³Laboratorio de Reprogramación Celular, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia.

*Unidad de Reproducción Humana (Servicio de Ginecología). Hospital Universitario la Fe, Valencia. Av/ Campanar 21, 46009, Valencia. e-mail: cristinacostana@hotmail.com

Fecha recepción: 30 abril 2010 • Fecha aceptación: 3 mayo 2010

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la técnica de vitrificación utilizando el método del Cryotip™ sobre la integridad del huso meiótico y la organización cromosómica en ovocitos humanos en metafase II. La configuración del huso meiótico y de la placa metafásica de los ovocitos frescos (control) y vitrificados se evaluó mediante microscopía confocal. La tasa de supervivencia para los ovocitos desvitrificados fue del 91,6%. La proporción de ovocitos que mostró una configuración normal del huso meiótico y de la placa metafásica fue similar en ovocitos frescos y vitrificados, sugiriendo que la técnica de vitrificación con el Cryotip™ permite mantener el potencial de los ovocitos una vez desvitrificados. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2010; 15(1):14-17.

Palabras clave: ovocitos metafase II, vitrificación, huso meiótico, organización cromosómica.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of vitrification procedure using the Cryotip™ method on spindle and chromosome configurations in metaphase II human oocytes. The meiotic spindle and chromosome configurations in fresh (control) and vitrified oocytes were studied by confocal microscopy. Survival rate for vitrified oocytes was 91.6%. The proportion of oocytes showing normal spindle and chromosome configuration was similar for fresh and vitrified oocytes showing that vitrification with the Cryotip™ method supports oocyte potential after warming. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2010; 15(1):14-17.

Keywords: metaphase II oocytes, vitrification, meiotic spindle, chromosome configuration

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de ovocitos permite preservar la fertilidad en pacientes que por diversas etiologías pueden desarrollar un Fallo Ovárico Prematuro (FOP). Es el caso de exposición a agentes quimio/radioterápicos, enfermedades autoinmunes o hematológicas, o procesos quirúrgicos potencialmente esterilizantes. La criopreservación ovocitaria puede emplearse también para evitar la criopreservación de embriones, para rescatar ciclos complicados con un síndrome de hiperestimulación ovárica o con ausencia de muestra seminal el día de la punción-aspiración folicular, para evitar

la sincronización donante-receptora en ciclos de donación de ovocitos o, simplemente, en mujeres fértiles que deseen posponer la maternidad.

La criopreservación ovocitaria utilizando la técnica de congelación convencional se considera un procedimiento experimental, debido a las bajas tasas de supervivencia y gestación y al limitado número de recién nacidos logrado (ASRM, 2006). Los protocolos de congelación/descongelación convencionales conllevan una reducción lenta de la temperatura en el tiempo, resultando en el daño de estructuras vitales de los ovocitos.

Los microtúbulos, que conforman el huso meiótico, y los microfilamentos, localizados en el córtex ovocitario, son muy susceptibles a la temperatura de enfriamiento (*chilling*) y a la exposición a los crioprotectores (Boiso et al., 2002). Una alteración en estas estructuras podría conducir a una alineación cromosómica incorrecta previa a la extrusión del corpúsculo polar, a una segregación cromosómica alterada, fecundación anómala y/o a una elevada incidencia de aneuploidías.

La vitrificación combina tasas de enfriamiento del orden de $-15.000^{\circ}\text{C a } -30.000^{\circ}\text{C}$ por minuto (Liebermann et al., 2003) y concentraciones elevadas de

crioprotectores, aumentando de tal manera su viscosidad que no cristaliza sino que forma un estado amorfo similar al vidrio.

La técnica de vitrificación permite burlar dos de los factores que limitan el éxito de la criopreservación: por un lado, el proceso conocido como *chilling injury* (Vatja and Kuwayama, 2006) y, por otro, la formación de cristales de hielo en el interior de las células (Mazur, 1984). El primero se define como el daño irreversible tras la exposición de las células a bajas temperaturas (de +15°C a -5°C) antes de que se produzca la enucleación del hielo. En consecuencia, estructuras celulares como el citoesqueleto o las membranas celulares se ven claramente afectadas. El fenómeno del *chilling* puede minimizarse durante el proceso de vitrificación mediante el empleo de tasas de enfriamiento elevadas (Liebermann et al., 2003). La velocidad de enfriamiento de la muestra va a depender del volumen de la solución de vitrificación, así, a menor volumen, mayor velocidad de enfriamiento, aumentando ésta mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido. Para evitar la formación de cristales de hielo, en la técnica de vitrificación se emplean elevadas concentraciones de crioprotectores (Liebermann et al., 2003), sin olvidar su efecto tóxico para las células. Sin embargo, una composición adecuada de crioprotectores puede solventar los efectos tóxicos y osmóticos debidos a la alta concentración de crioprotectores en la solución de vitrificación. La mezcla de crioprotectores más utilizada es la formada por etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) y sacarosa.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la criopreservación ovocitaria mediante la técnica de vitrificación con un sistema cerrado (Cryotip™) sobre la integridad del huso meiótico y la organización cromosómica en ovocitos humanos Metafase II (MII).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ovocitos MII:

A todas las pacientes que formaron parte del estudio se les aplicó un protocolo de

hiperestimulación ovárica controlada que incluyó, como frenado hipofisario, agonistas de la GnRH en protocolo largo y como estimulación FSH recombinante. Los ovocitos se recuperaron por punción transvaginal ecoguiada, 36-38 horas tras la administración de la hCG. Los complejos cúmulo-ovocito fueron cultivados en medio IVF (Universal IVF Medium, Medicult, Jyllinge, Denmark) bajo condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% de CO₂). Tras al menos 2 horas de cultivo in vitro, los ovocitos fueron incubados con 80 IU/mL hialuronidasa (Hyadase, Medicult, Jyllinge, Denmark) y las células del cúmulo fueron eliminadas mediante el pipeteado mecánico de los ovocitos. Los ovocitos fueron entonces observados utilizando un microscopio invertido (x200) y los ovocitos MII se identificaron por la presencia del primer corpúsculo polar.

Se vitrificaron un total de 12 ovocitos en estadio de MII recuperados de pacientes incluidas en el Programa de Fecundación in vitro del Instituto de Medicina Reproductiva (IMER) de Valencia que firmaron el correspondiente consentimiento informado. Como grupo control (ovocitos MII no vitrificados), se incluyeron 6 ovocitos procedentes de pacientes pertenecientes al Programa de Fecundación in vitro de la Unidad de Reproducción del Hospital Universitario la Fe de Valencia, previa firma del consentimiento de participación en un Proyecto de Investigación desarrollado en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de Valencia y con licencia por parte del Instituto de Salud Carlos III.

Protocolo de vitrificación:

Para la vitrificación ovocitaria se utilizó el kit comercial de Irvine Scientific con el Cryotip™ como contenedor. Los ovocitos fueron equilibrados en una solución compuesta por 7.5% (v/v) de DMSO + 7.5% (v/v) de EG + 20% suplemento sustitutivo de suero en medio 199. Posteriormente, fueron expuestos a la solución de vitrificación compuesta por 15% (v/v) de DMSO + 15% (v/v) de EG + 0.5M de sacarosa + 20% suplemento sustitutivo de suero en medio 199 y cargados en el Cryotip™. Para la desvitrificación, los ovocitos fueron expuestos a soluciones

compuestas por medio 199 con concentraciones decrecientes de sacarosa (1.0M y 0.5M).

La supervivencia ovocitaria se evaluó inmediatamente tras la desvitrificación y tras 4 horas de cultivo in vitro, valorándose la integridad de la zona pelúcida, la apariencia del citoplasma y la ausencia de lisis celular.

Fijación y tinción inmunocitoquímica:

La fijación de los ovocitos y tinción inmunocitoquímica del huso meiótico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lin et al. (2008).

Brevemente, los ovocitos MII desvitrificados y frescos (grupo control) fueron fijados a 37°C durante 1 hora en una solución de formaldehído al 2% y permeabilizados en una solución de Tritón X-100 al 0.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la tinción de la tubulina, los ovocitos se incubaron durante 90 minutos a 37°C en una solución de anticuerpos primarios anti- α y anti- β tubulina (1/400), seguido de 3 lavados y se incubaron durante 120 minutos a 37°C en una solución de anticuerpo secundario Alexa 488 (1/200). Para la tinción de microfilamentos, los ovocitos se incubaron en una solución de rodamina-faloidina durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los ovocitos fueron montados utilizando medio de montaje con DAPI y mantenidos a 4°C hasta su evaluación.

Evaluación del huso meiótico:

Para la valoración de los microtúbulos, microfilamentos y cromosomas, se utilizó un microscopio confocal con laser-scanning (Leica DM IRE 2) equipado con un láser de argón, perteneciente al Servicio de Microscopía Confocal del CIPF de Valencia.

RESULTADOS

Se vitrificaron y desvitrificaron 12 ovocitos MII. La tasa de supervivencia fue del 91,6% (11/12). Todos los ovocitos que sobrevivieron a la desvitrificación mostraron una apariencia morfológica normal tras 4 horas de cultivo in vitro.

Se fijaron para tinción inmunocitoquímica 10 ovocitos MII desvitrificados y 6 ovocitos MII frescos. La tasa de ovocitos informativos fue del 100% para el grupo control y del 70% para los ovocitos desvitrificados. Esta menor tasa de informatividad para ovocitos desvitrificados fue debida a problemas acontecidos durante la tinción, con independencia de la técnica de vitrificación.

En función de la orientación del complejo huso/cromosomas respecto al plano focal, se consideró una configuración normal si: a) cuando al estar orientado de forma paralela al plano focal el huso presenta una estructura típica en forma de barril con los polos ligeramente señalados y los cromosomas dispuestos en el ecuador, b) cuando al estar orientado de forma perpendicular al plano focal el huso presenta una estructura circular con los cromosomas orientados en forma de círculo y c) cuando al estar orientado de forma oblicua al plano focal el huso presenta una estructura en forma oval (barril acortado) con los cromosomas alineados en el ecuador. Por otro lado, una configuración anómala del complejo huso/cromosomas quedó representada por una desorganización parcial o completa de los microtúbulos o por una dispersión cromosómica o apariencia cromosómica aberrante o poco condensada. En las Figuras 1 y 2 se muestran una configuración normal y una anómala del complejo huso/cromosomas, respectivamente.

La proporción de ovocitos con una configuración normal del huso meiótico y una alineación correcta de los cromosomas fue del 100% para los ovocitos del grupo control y de 85,7% para los ovocitos desvitrificados, sin que se observaran diferencias significativas entre ambos grupos.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evalúa el efecto de la técnica de vitrificación con un sistema cerrado (Cryotip™) sobre la configuración del huso meiótico y la organización cromosómica en ovocitos humanos en estadio de MII. La integridad de este complejo es imprescindible para que se produzca una

correcta segregación cromosómica y evitar así la posible aparición de aneuploidías en el embrión. Aunque sólo se observaron anomalías en el huso meiótico/cromosomas en el grupo de ovocitos desvitrificados, las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control (frescos). Estos resultados son similares a los descritos en la bibliografía (Li et al., 2006; Cobo et al., 2008).

La vitrificación utilizando el Cryotip™ como contenedor permite la vitrificación de ovocitos en microvolúmenes (alrededor de 1 μ L), incrementando la tasa de enfriamiento y minimizando el efecto tóxico de los crioprotectores al disminuir su concentración. El mantenimiento de la integridad del huso meiótico y de la placa metafásica tras la desvitrificación sugiere que dicha técnica de vitrificación permite preservar la calidad inicial del ovocito y el potencial necesario para soportar el posterior desarrollo embrionario.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido parcialmente financiado por el Programa de Medicina Regenerativa del Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boiso I, Martí M, Santaló J. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Human Reprod* 2002; 17: 1885-1891.

Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohí J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 3: 350-359.

Li Y, Feng HL, Cao HL, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S, Critser JK, Chen ZJ. Confocal microscopic analysis of the spindle and

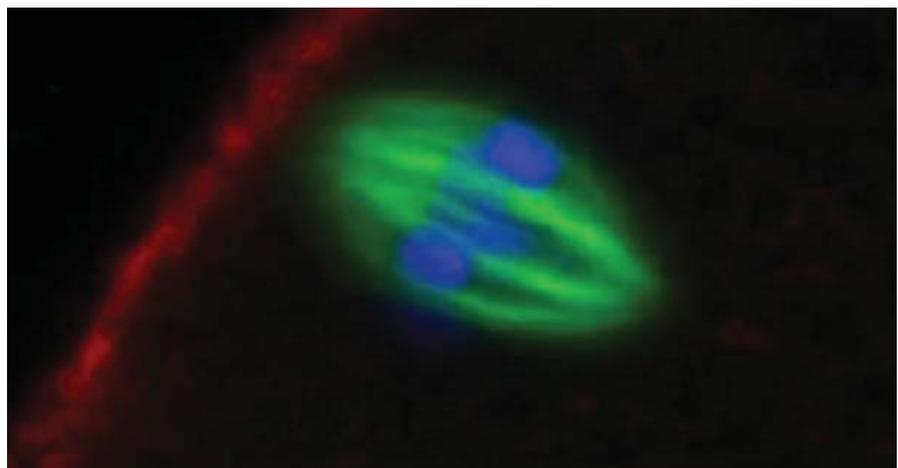


Figura 1: Configuración normal del complejo huso meiótico-placa metafásica.

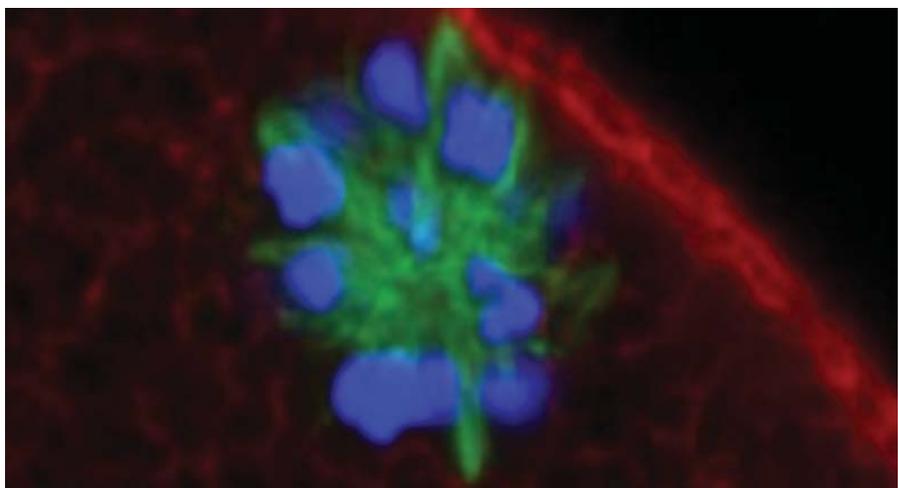


Figura 2: Configuración anómala del complejo huso meiótico-placa metafásica.

chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertil Steril* 2006; 85 (4): 827-832.

Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 623-633.

Lin T, Tsay C, Chen C, Tang P, Ju J. Nuclear and cytoskeletal dynamics during oocyte maturation and development of somatic cell cloned pig embryos injected with membrane disintegrated donor cells. *Anim Reprod Sci* 2008; 103: 107-119.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: C125-42.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Practice

Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2006; 86: S142-7.

Vatja G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenol* 2006; 65: 236-244.

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



La calidad, nuestro objetivo

MARQUE LA DIFERENCIA EN EL LABORATORIO CON LOS NUEVOS SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD

Nuevos Sistemas Olympus IMSI

Evalúe la morfología del espermatozoide

a altos aumentos con el mismo microscopio de ICSI



OCTAX polarAIDE

OCTAX polarAIDE evaluación automática de la calidad de los ovocitos

Visualización del huso y comprobación de la viabilidad de congelado-descongelado de los ovocitos en metafase II



pH Online™

Sistema de monitorización continua del pH en los incubadores a tiempo real.



OCTAX Laser Shot™

Sistema de laser diodo especialmente diseñado para técnicas de reproducción asistida.

CTAX



HTF
HTF Hepes
Aceites

Gradientes
PVP
PGD

Acido Tiroses
Hialuronidasa



Global Fertilización - Global Cultivo
Global w/Hepes - Global PGD

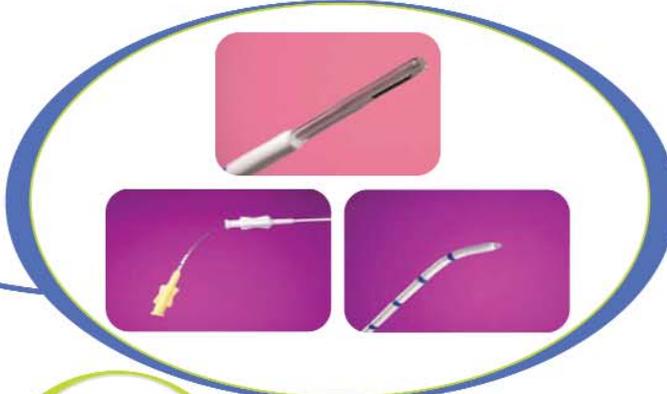
- NUEVO**
- Albumina con factor de crecimiento α y β Globulinas
 - Sistema Global S3 para Vitrificación de Blastocistos



Pipetas ICSI



Catéter de Transferencia Ecogénico



Agujas de punción OPS



Incubador CO2



Termometro FIV



Medidor de PH



Estaciones de trabajo



Mesas Antivibratorias



Placas Calefactadas



Selladora por ultrasonidos



Baño en seco



Centrifuga FIV

LAS VARIANTES CROMOSÓMICAS AFECTAN LA CALIDAD EMBRIONARIA

CHROMOSOMAL VARIANTS AFFECT EMBRYO QUALITY

Mireia Poveda¹, Teresa Rubio², Isabel Ochando³, Laura Gil¹, Manuel Lloret¹, José Jesús López-Gálvez¹, Antonio Urbano³, Juan Manuel Moreno¹, Joaquín Rueda^{3,4}.

¹Unidad de Reproducción, Hospital Clínica Vistahermosa de Alicante

²Unidad de Reproducción, Clínica Virgen de la Vega, Murcia

³Unidad de Genética, Hospital Clínica Vistahermosa de Alicante

⁴Área de Biología Celular, Universidad Miguel Hernández, Alicante

e-mail: lab@urvistahermosa.com • Fecha recepción: 30 abril 2010 • Fecha aceptación: 10 mayo 2010

RESUMEN

El objetivo de este estudio es evaluar si la presencia de alguna variante cromosómica en el cariotipo puede afectar a los resultados de los ciclos de ICSI.

Se ha realizado un estudio prospectivo de 81 ciclos de ICSI realizados en nuestro centro en los que algún miembro de la pareja presenta variantes cromosómicas y 169 ciclos de pacientes sometidos a la misma técnica pero con cariotipos normales. En estos ciclos, se ha obtenido la media de ovocitos recuperados, media de ovocitos maduros, tasa de fecundación, porcentaje de fallos de fecundación, porcentaje de embriones de grado A-B transferidos y tasa de gestación y aborto. Los resultados muestran que las variantes más frecuentes son las que afectan al cromosoma 9. Se observa que existen diferencias significativas en la calidad de los embriones que se transfieren, empeorando en los ciclos con variantes cromosómicas. Los resultados nos sugieren que las variantes cromosómicas pueden tener un efecto sobre la gametogénesis, por lo que los embriones generados en estos ciclos de ICSI en los que algún miembro de la pareja presenta variantes cromosómicas son de peor calidad, pero este hecho no afecta a la viabilidad embrionaria. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(1):19-23.

Palabras clave: infertilidad, variante cromosómica, gametogénesis, calidad embrionaria.

ABSTRACT

The aim of this study is to assess whether the presence of some variant chromosome in the karyotype may affect the outcome of ICSI cycles.

We performed a prospective study of 81 ICSI cycles performed in our center in which one partner has chromosomal variants and 169 cycles of patients undergoing the same technique but with normal karyotypes. In these cycles, we have obtained the average of oocytes retrieved, mean mature oocytes, fertilization rate, fertilization failure rate, percentage of A-B grade embryos transferred and pregnancy rate and abortion.

The results show that the most frequent variants are affecting chromosome 9. It is noted that there are significant differences in the quality of embryos transferred in cycles with worsening chromosome variants. We suggest that chromosome variants may have an effect on gametogenesis, so that the embryos produced in these cycles of ICSI in which a partner has chromosome variants are worst but this not affect embryonic viability. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(1):19-23.

Keywords: infertility, chromosomal variation, gametogenesis, embryo quality.

INTRODUCCIÓN

El genoma se divide en dos partes funcionalmente diferentes y que se pueden visualizar en los cromosomas en forma de eucromatina y heterocromatina. La eucromatina es la parte más activa del genoma y más rica en genes. La heterocromatina se divide en heterocromatina facultativa, que contiene información de algunos genes

que no se expresan o que se expresan en algún momento (como el corpúsculo de Barr) y la heterocromatina constitutiva, formada por secuencias altamente repetidas y comprimidas como secuencia satélite, generalmente pobres en genes. Esta heterocromatina es polimórfica, probablemente debido a la intensidad del ADN satélite.

Estos polimorfismos pueden afectar no

solamente al tamaño, sino también a la localización de la heterocromatina; aparentemente no tienen traducción fenotípica (Mattei et al., 2003) y se conocen como variantes cromosómicas. Las variantes se deben al aumento de heterocromatina constitutiva y suelen ser más frecuentes en los cromosomas 1, 9, 16 y en los acrocéntricos. Estas variantes cromosómicas se identifican a nivel microscópico y pueden tener

diferente tamaño, morfología y propiedades tintoriales, pudiéndose transmitir a la descendencia o aparecer de novo, estimándose su incidencia de un 3,12% en la población general (Bhasin, 2005). Se sabe que muchos de los genes necesarios para la viabilidad embrionaria y la fertilidad residen en la heterocromatina; es por ello que la presencia de estas variantes se ha relacionado con diferentes procesos patológicos entre los que está la infertilidad (Madon et al., 2005; Minocherhomji et al., 2009).

Algunos estudios señalan que en casos de abortos espontáneos y en la infertilidad idiopática, la presencia de variantes cromosómicas en uno o ambos miembros de la pareja es más frecuente (Dubey et al., 2005). Además, estudios recientes han demostrado que existe una mayor prevalencia de las anomalías cromosómicas numéricas y variantes polimórficas en pacientes sometidos a procesos de reproducción asistida, tales como la fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Minocherhomji et al., 2009), teniendo en estos ciclos menores tasas de embarazo e implantación (Scholtes et al., 1998). El objetivo de nuestro estudio es evaluar si la existencia en el cariotipo de alguna variante cromosómica puede afectar a los resultados de los ciclos de ICSI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio prospectivo de 250 ciclos de ICSI, de los cuales en 81 de ellos al menos un miembro de la pareja presentaba una variante cromosómica en el cariotipo. Los resultados de estos 81 ciclos se han comparado con 169 ciclos realizados desde Junio a Septiembre de 2008 de pacientes no seleccionados, sometidos a la misma técnica pero con cariotipos normales.

De los ciclos estudiados, se excluyeron los ciclos en los que se ha utilizado semen procedente de biopsia testicular y ciclos en los que el número de ovocitos recuperados es menor a 3, eliminando así tanto el factor masculino severo como las bajas respondedoras, en los que los fallos de fecundación son más frecuentes.

En todos estos ciclos se han obtenido los siguientes datos: media de ovocitos recuperados, media de ovocitos maduros, tasa de fecundación, porcentaje de fallos de fecundación, porcentaje de embriones de buena calidad (grado A-B) transferidos y tasas de gestación clínica y aborto.

Se ha comparado también la presencia de variantes por sexos, con el fin de observar si la presencia de las variantes cromosómicas tiene el mismo efecto sobre los ciclos de ICSI, si se presenta en el cariotipo del hombre o en el de la mujer.

Procedimiento FIV-ICSI

A todas las mujeres se les aplicó un protocolo de hiperestimulación ovárica controlada (HOC), siguiendo los protocolos de estimulación largo con agonistas, con antagonistas o corto, dependiendo de la indicación ginecológica. En todos ellos se utilizó para la estimulación ovárica medicación recombinante. La ovulación fue inducida con 10.000 UI de hCG, que se administró cuando los folículos alcanzaron un diámetro igual o mayor de 18 mm. La punción folicular se efectuó por vía transvaginal ecoguiada a las 36 horas de la inyección de hCG. La fase lútea fue apoyada con progesterona vía vaginal u oral, comenzando el mismo día de la punción.

Los ovocitos recuperados fueron fecundados siguiendo el protocolo estándar, utilizando los medios de cultivo comerciales Vitrolife®. La fecundación de los ovocitos se confirmó con la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares entre las 16-19 horas tras la inseminación. A los embriones procedentes de estos ciclos, se les realizó un seguimiento de su evolución y aspecto morfológico desde el día de la punción hasta el día de su transferencia (67-71 horas post-ICSI). Dependiendo de su morfología y desarrollo, estos embriones fueron catalogados en cuatro categorías siguiendo los criterios de valoración morfológica de ASEBIR (Arday et al., 2007).

La transferencia se realizó mediante control ecográfico y dos semanas después se solicitó una β -hCG para

confirmar el embarazo. Se consideró gestación clínica cuando se visualizó latido cardiaco fetal.

Estudio citogenético

El estudio del cariotipo se llevó a cabo en linfocitos de sangre periférica, cultivados a 37° C durante 72 horas en dos cultivos paralelos con Chromosome (Genycell Biotech) y RPMI suplementado con suero fetal y fitohemaglutinina.

Se analizaron un mínimo de 20 metafases y se cariotiparon al menos 3 metafases por caso, teñidas con bandas G (Seabright, 1971), según las directrices de la ECA (European Cytogeneticists Association) (Hastings et al., 2007).

Análisis estadístico

Se utilizó el test de la Chi-cuadrado de Pearson para calcular la significación estadística de los datos y analizar la correlación, si la hay, entre las variables de los grupos con variante y sin variante cromosómica. Para ello, se utilizó el programa SPSS. Se ha considerado que existen diferencias significativamente estadísticas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

De los 250 ciclos de ICSI estudiados a los que se les realizó un estudio citogenético, se encontró alguna variante polimórfica del cariotipo en 81 ciclos; en tres de estos ciclos ambos miembros de la pareja presentaban algún tipo de variante. En éstos se observó que las variantes cromosómicas más frecuentes fueron las que afectan al cromosoma 9, presente en un 73% de los casos (el 37% de los ciclos en mujeres y el 36% en hombres), siendo la variante 9qh+ la que se presentó con más frecuencia, en un 65% de los casos. La variante 21ps+ se presenta en un 14,3% de los ciclos en mujeres y en un 7,14% de los ciclos en hombres. El resto de variantes está en un porcentaje inferior al 10%. La distribución de los pacientes portadores de algún tipo de variante cromosómica se muestra en la Tabla I, y en la Figura 1 se identifica algunos cromosomas con variantes cromatínicas.

Los resultados de los ciclos de ICSI en

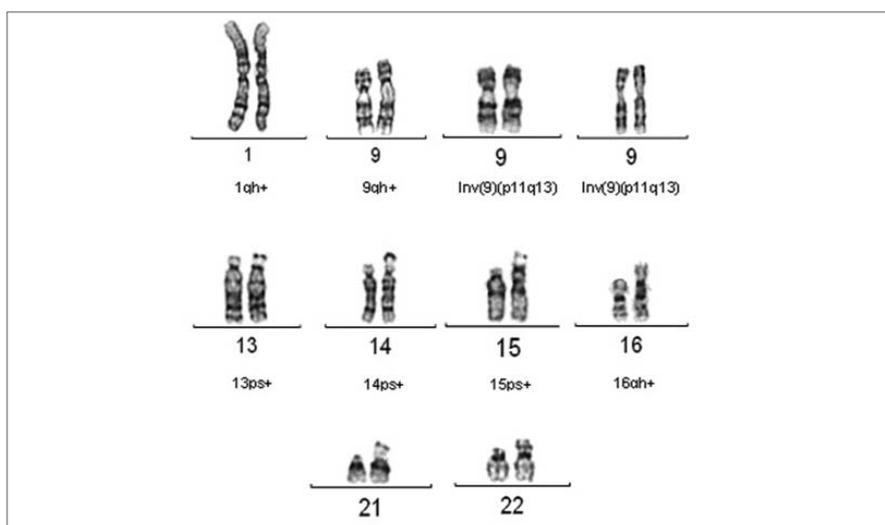


Figura 1. Diferentes tipos de variantes que implican a distintos cromosomas.

Polimorfismos heterocromatina	Mujeres (n=42)	Hombres (n=42)
1qh+	4	0
9qh+	27	28
inv(9)(p11q13)	4	2
14ps-	0	2
16qh+	0	1
21ps+	6	3
22ps+	1	6

Tabla I. Distribución de los pacientes portadores de variantes cromosómicas.

Resultados ciclo ICSI	Ciclos con cariotipos normales (n=124)	Ciclos con variante cromosómica (n=63)
Media edad	34,16 ± 3,72	34,72 ± 3,44
Media de ovocitos recuperados	13,41 ± 6,86	11,56 ± 5,03
Media de ovocitos MII recuperados	8,26 ± 4,79	6,90 ± 4,46
Tasa de fecundación (%)	67%	63%
Fallos de fecundación (%)	4,3%	8,5%
Embriones de grado A transferidos	78,9%*	48,6%
Tasa de gestación	36,3%	34,0%
Tasa de aborto	13,8%	22,2%

Tabla II. Resultado de los ciclos de ICSI. En ambos grupos se han eliminado bajas respondedoras (menos de 3 ovocitos recuperados) y ciclos con sémenes de biopsias. *P<0,05

ambos grupos, en los que hemos excluido las bajas respondedoras y los ciclos con biopsias testiculares, se observan en la Tabla II. Estos resultados muestran que no existen diferencias entre los dos grupos en cuanto a

promedio en la edad de la mujer. La media de ovocitos maduros recuperados tras la punción no es significativamente mayor en los ciclos con variantes cromosómicas que en los ciclos sin variantes. A pesar de que la tasa de

fecundación es muy similar en ambos grupos, el porcentaje de fallos de fecundación es mayor, pero no significativo, en los ciclos en los que alguno de los miembros de la pareja tiene alguna variante de la normalidad que en los ciclos con cariotipos normales. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de embriones de buena calidad transferidos en día 3 de cultivo, de forma que los embriones obtenidos en los ciclos donde algún miembro de la pareja tiene un cariotipo con variante cromosómica son significativamente de peor calidad que los embriones obtenidos en los ciclos donde los progenitores tienen cariotipos normales.

Las tasas de embarazo y aborto fueron muy similares en ambos grupos, sin presentar diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a los resultados obtenidos si comparamos el efecto de las variantes por sexos, no observamos diferencias significativas en ningún parámetro (Tabla III).

DISCUSIÓN

El resultado más importante del presente trabajo es que las variantes cromosómicas tienen relación directa con la calidad embrionaria, si bien este hecho parece no afectar a la viabilidad del embrión.

Se sabe que los factores genéticos tienen un papel muy importante en la esterilidad (Matzuk et al., 2008). Las razones genéticas de la infertilidad son complejas y tienen distintas consecuencias. Estas causas pueden ser cromosómicas, monogénicas o multifactoriales, y pueden afectar a cualquier etapa del desarrollo embrionario (Shah et al., 2003).

Está bien establecido el papel que las alteraciones cromosómicas juegan en la infertilidad, y su diagnóstico (Duzcan et al., 2003); sin embargo, el efecto de las variantes cromosómicas está lejos de aclararse, habiéndose convertido en un campo de controversia en citogenética clínica reproductiva (Madon et al., 2005). Existen autores que concluyen que las variantes cromosómicas no

Resultados ciclo ICSI	Ciclos con cariotipos alterados en mujeres (n=32)	Ciclos con cariotipos alterados en hombres (n=31)
Media de ovocitos recuperados	11,68 ± 5,43	10,45 ± 4,97
Media de ovocitos MII recuperados	7,23 ± 3,93	6,13 ± 3,45
Tasa de fecundación (%)	62,7%	63,7%
Fallos de fecundación (%)	13,3%	3,44%
Embriones de grado A transferidos	58,5%	39,6%
Tasa de gestación	34,6%	33,3%
Tasa de aborto	22,2%	22,2%

Tabla III. Resultados de los ciclos de ICSI. Distribución por sexos.

tienen efectos fenotípicos y, por otro lado, también hay un número considerable de publicaciones que aportan datos en sentido contrario (Madon et al., 2005; Gardner et al., 2004; Wyandt et al., 2004).

En los últimos años, varios estudios han analizado la relación de las alteraciones cromosómicas y la infertilidad (Nakamura et al., 2001). En alguno de estos estudios se ha visto que las variantes cromosómicas se encuentran en una frecuencia más elevada en pacientes infértiles que en la población general (Yakin et al., 2005; Madon et al., 2005; Rueda et al., 2007). De hecho, en nuestro medio hemos observado que sobre un 12% de los pacientes que acuden a consulta de reproducción por fallo reproductivo presentan algún tipo de variante cromosómica (Rueda et al., 2007). Se ha observado que las variantes polimórficas en los cromosomas 1, 9, 16, y en el cromosoma Y son más frecuentes en la personas infértiles que en la población general (Madon et al., 2005), habiéndose sugerido que la presencia de estas variantes en uno o ambos miembros de la pareja podría incrementar la frecuencia de abortos de repetición e infertilidad idiopática (Dubey et al., 2005). La mayor parte de datos indican que la variante cromosómica más frecuente, con gran diferencia, afecta al cromosoma 9, como así observamos

también en el presente estudio.

Se sabe que la región pericéntrica del cromosoma 9 situada entre las regiones 9p11-12 y 9q11-12/13 es rica en heterocromatina en la que abundan repeticiones de DNA satélite. La secuenciación del DNA y la cartografía del cromosoma 9 ha permitido demostrar, recientemente, que este cromosoma es estructuralmente muy polimórfico y contiene la región más larga de heterocromatina que hay en los seres humanos (Humphray et al., 2004). Es necesario analizar estudios moleculares genéticos y análisis epigenéticos de las regiones heterocromáticas para ver si pueden afectar a genes vecinos implicados en infertilidad.

Al comparar los ciclos de ICSI en los que al menos un miembro de la pareja presentaba alguna variante cromosómica en el cariotipo con los ciclos en los que los cariotipos de ambos progenitores son normales, observamos que no existen diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a la tasa de fecundación y los fallos de fecundación. Tampoco hay diferencias en la tasa de embarazo, pero, sin embargo, la calidad de los embriones que se transfieren empeora en los ciclos con variantes cromosómicas, y, a pesar de que la tasa de aborto no es significativamente mayor en los ciclos

con variantes, si hay una tendencia a que ésta sea mayor cuando los cariotipos están alterados. El empeoramiento de la calidad embrionaria cuando algún miembro de la pareja presenta variantes polimórficas en el cariotipo nos lleva a pensar en la presencia de alguna alteración en los gametos y, de hecho, un número significativo de los varones con variantes cromosómicas tienen unas cifras de aneuploidias por encima de lo normal (Rueda et al., 2007), lo que sugiere que las variantes cromosómicas podrían tener un efecto sobre la meiosis. Varios estudios han demostrado que la presencia de variantes cromosómicas está relacionada con la alteración de la espermatogénesis (Kayhan et al., 2005), observándose que estas variantes son más frecuentes en pacientes con oligozoospermia severa o azoospermia que en pacientes con oligozoospermia leve o normozoospermia (Riccaboni et al., 2008).

A pesar de la alta incidencia de variantes cromosómicas en pacientes infértiles, está lejos de dilucidarse su mecanismo de acción. Es más, el presente estudio pone de manifiesto que cuando los gametos de los portadores de variantes se emplean para ICSI, a pesar de la peor calidad embrionaria, no hay efectos sobre la viabilidad del embrión.

Recientemente, se ha demostrado que las variantes cromosómicas no tienen relación con los abortos de repetición, pero sí con la infertilidad primaria (Minocherhomji et al., 2009). Datos de nuestro grupo indican que las parejas con algún miembro con cariotipo portador de variante del cromosoma 9 tienen peores tasas de fecundación que los pacientes con cariotipos normales cuando se hace IA (Ochando et al., 2007), hecho que no ocurre cuando es la ICSI la técnica empleada.

Parece pues, que los pacientes portadores de variantes cromosómicas originan una mayor tasa de gametos con anomalías posiblemente implicadas en el reconocimiento celular pero que, una vez producida la fecundación, la afectación sobre la viabilidad del embrión sería mínima. La conclusión principal de nuestro trabajo es que los portadores de variantes cromosómicas, se beneficiarían de la técnica ICSI; por

ello, es fundamental destacar la importancia del estudio citogenético como parte del diagnóstico de la pareja con fallo reproductivo, y de los donantes de gametos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arday M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrero R, Moreno JM, et al. Cuadernos de Embriología clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Editado por ASEBIR 2007.

Bhasin M. Human population cytogenetics: a review. *Int J Hum Genet* 2005;5:83–152.

Dubey S, Chowdhury MR, Prahlad B, Kumar V, Mathur R, Hamilton S, et al. Cytogenetic causes for recurrent spontaneous abortions—an experience of 742 couples (1484 cases). *Indian J Hum Genet* 2005;11:94–8.

Duzcan F, Munevver G, Ozan G, Bagci H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:53–6.

Gadner RJ, Stuhlerland SR. Variant chromosomes and abnormalities of no phenotypic consequence. *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. Eds. Gadner RJ, Stuhlerland JR. Oxford Univ. Press 2004; 233–248.

Hastings RJ, Cavan S, Bricarelli FD. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance. *Eur J Hum Genet* 2007;15:525–7

Humphray SJ, Oliver K, Hunt AR, Plumb RW, Loveland JE, Howe KL, et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature* 2004;429:369–74

Kayhan Y, Basak B, Bulent U. Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 2005;12:984–9.

Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nature Medicine* 2008; 14:1197–1213.

Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online* 2005;11:726–32. Mattei MG, Luciani J. Heterochromatin, from

chromosome to protein. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. January 2003. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/HeterochromEng.html>

Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Shonali A. Uttamchandani, and Firuza R. Parikh. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil and Steril* 2009;92:88–95

Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, et al. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol* 2001;8:49–52.

Ochando I, Moreno JM, Gil L, Poveda M, López-Gálvez JJ, Lloret M et al. Variantes citogenéticas del cromosoma 9 en infertilidad. Congreso ASEBIR 2007.

Riccaboni A, Lalatta F, Caliarì I, Bonetti S, Somigliana E, and Ragni G. Genetic screening in 2,710 infertile candidate couples for assisted reproductive techniques: results of application of Italian guidelines for the appropriate use of genetic tests. *Fertil and Steril* 2008;89:800–8.

Rueda J, Moreno JM, Ochando I, Gil L, López JJ, Lloret M et al. Chromosome heteromorphisms in infertile couples. *Chromosome Res*, 2007;15:35–36.

Scholtes M, Behrend C, Dietzel-Dahmen J.G., van Hoogstraten D, Marx K, Wohlers S, et al. Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil and Steril* 1998;70:933–7.

Seabright MA. Rapid banding techniques for human chromosomes. *Lancet* 1971;2:971–2.

Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempet H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction* 2003;126:13–25.

Wyandt HE, Tonk VS. Atlas of human chromosome heteromorphisms. Ed. Kluwer. Academic Publishers 2004.

Yakin K, Balaban B, Urman B. Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? *Int J Urol* 2005;12:984–9.



Pedidos sin
calendario
y entregas
en las 24/48 h

NUESTRA LÍNEA
DE PRODUCTOS :

BioCare Europe

es una empresa que actúa exclusivamente
en el sector de la reproducción asistida.

Desde 1997 brinda a los especialistas
de este sector un servicio con un perfil
muy profesional y especializado.

BioCare Europe es especializada
en el abastecimiento de material de consumo,
medios de cultivo, micropipetas,
agujas de punción y placas de Nunc



REPROLINE

medical



nunc™

**HUNTER
SCIENTIFIC
LIMITED**

 **BioCare**
EUROPE

www.biocareeurope.com
ifo@biocareeurope.com
Tel. +39.06.44.24.03.41
Fax +39.06.44.24.03.58
Número Verde desde España:
900993936

RELACIÓN ENTRE LOS PATRONES PRONUCLEARES Y LA CALIDAD EMBRIONARIA SEGÚN CRITERIOS ASEBIR

RELATION BETWEEN PRONUCLEAR PATTERN AND EMBRYO QUALITY IN ACCORDANCE TO ASEBIR CRITERIA

Marta Brossa, Xènia Blanch, Marta Antich

FertiLAB – Institut Català de Fertilitat · Alta Gironella 58, Bajos. 08017 Barcelona

laboratorifertilab@hotmail.com · Fecha recepción: 23 abril 2010 · Fecha aceptación: 26 abril 2010

RESUMEN

La observación del patrón pronuclear en estadio de cigoto se ha propuesto en varios estudios como una de las características predictivas del desarrollo embrionario y la capacidad implantatoria. En este estudio hemos observado de forma retrospectiva 3424 embriones procedentes de 619 ciclos de FIV-ICSI realizados en nuestro centro entre 2008 y 2009, para establecer si existía alguna relación entre el patrón pronuclear observado el día de la fecundación, a partir de cuatro grupos de clasificación (patrones GI, GII, GIII y GIV) y la calidad embrionaria observada en estadio celular (día 2, día 3) según los criterios propuestos por ASEBIR. Hemos comprobado con significancia estadística que, en nuestro estudio, la distribución de calidades en función del patrón pronuclear no se da de forma aleatoria, apreciándose diferencias sobre todo en el desarrollo de los embriones procedentes de cigotos GI (mayor porcentaje de embriones con desarrollo de calidad A: 35,6% vs. el 31,1% general) y en embriones procedentes de cigotos GIII (mayor probabilidad de desarrollo de embriones de calidad D: 47,1% vs. 38,0% general) para día 3.

Dado que la clasificación del patrón pronuclear se realiza simultáneamente a la valoración de la fecundación y con ello, el aumento del estrés al que se somete el embrión en dicha valoración no es significativo, consideramos que merece la pena seguir contando con este dato como uno más de los elementos a tener en cuenta a la hora de decidir cuál o cuáles son los mejores embriones para transferir. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(1):25-28.

Palabras clave: patrón pronuclear, calidad embrionaria, criterios ASEBIR.

ABSTRACT

The observation of pronuclear pattern of zygote stage has been proposed in several studies as one of the predictive characteristics of embryo development and implantation capacity. In this study, we have observed retrospectively 3424 embryos from 619 IVF-ICSI cycles performed in our centre between 2008 and 2009, to establish whether there was any relationship between pronuclear pattern observed on the day of fertilization, from four groups of classification (pattern GI, GII, GIII and GIV) and embryo quality observed in cell stage (day 2, day 3) according to the criteria proposed by ASEBIR. We checked with statistical significance that, in our study, the distribution of qualities based on pronuclear pattern does not occur randomly, appreciating differences particularly in the development of embryos from zygotes GI (greater percentage of embryos with development of quality A: 35.6% vs. 31.1% overall) and in embryos from zygotes GIII (greater chance of developing embryos of quality D: 47.1% vs. 38.0% overall) for day 3.

Since pronuclear pattern classification is performed simultaneously to the assessment of fertilization and thus the increase of stress to the embryo in that evaluation is not significant, we believe that it is worth to continue taking this as one more of all the elements to take into account when deciding what are the best embryos to transfer. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(1):25-28.

Key words: nuclear pattern, embryo quality, ASEBIR criteria.

INTRODUCCIÓN

La valoración del desarrollo de un ciclo de fecundación in vitro empieza ya el día de la punción ovocitaria, con la determinación de la calidad de los gametos para predecir el devenir del ciclo y aumentar las probabilidades de éxito. Cada vez se desarrollan nuevos

elementos para permitirnos conseguir embriones de mejor calidad y, en consecuencia, con mayor potencial implantatorio. La valoración exhaustiva de dicho potencial en los embriones obtenidos de FIV – ICSI es un tema al que dedicamos mucha atención en los laboratorios, observándolos en todos sus estadios, desde el día de la punción

hasta el momento de la transferencia. En la bibliografía podemos encontrar varias características a observar, tanto en gametos como en cigotos y embriones (Senn et al., 2006; Balaban et al., 2001; Wittemer et al., 2000; Tesarik and Greco, 1999; Tesarik et al., 2000; Scott et al., 2000; Gámiz et al., 2003), que se correlacionan con la obtención de

embriones de mejor calidad. Toda observación realizada es interesante pero a la vez conlleva un mayor estrés para el embrión, dado que cada determinación se acompaña de un mayor tiempo de observación y, por tanto, generalmente, de exposición fuera de los incubadores. Cada centro debería determinar qué características le permiten una mayor y mejor valoración de la calidad embrionaria en relación a sus resultados, puesto que no todos coinciden en hallar las mismas correlaciones (James et al., 2006).

En nuestro laboratorio realizamos un cultivo individualizado de los embriones, observando el patrón de pronúcleos (PN) que presentan en día 1 (Gámiz et al., 2005) (ver Figuras 1 y 2) y su evolución y calidad (según criterios ASEBIR) hasta el día de la transferencia (día 2 o día 3). Dado que, como ya se ha

dicho, la determinación del patrón de pronúcleos conlleva un mayor tiempo de observación y, por tanto, de exposición de los cigotos fuera de los incubadores y, teniendo en cuenta que en otros laboratorios se observa la fecundación sin determinar el patrón pronuclear, obteniendo también muy buenos resultados, decidimos estudiar si, en nuestro centro, hallábamos una relación entre el patrón pronuclear y la calidad embrionaria, para decidir si merecía la pena seguir con la valoración de dichos patrones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo, comparando la relación entre los patrones pronucleares y la calidad embrionaria de 3424 cigotos obtenidos en 619 ciclos de FIV-ICSI, tanto propios como de recepción ovocitaria (edad media 32,0 años –edad

mínima 19; edad máxima 47–, tomando la edad de la persona a quien se realiza la punción, es decir, la donante en los ciclos de recepción y la paciente en los ciclos propios) realizados en nuestro centro durante los años 2008 – 2009.

Se han excluido del estudio aquellos cigotos en los que, a pesar de observarse la presencia de 2PN, estos aparecían tenues y no quedaba bien definido qué patrón pronuclear les correspondía.

Del total de embriones, 1335 fueron observados hasta día 2 y 2089 hasta día 3.

Los patrones pronucleares de referencia se muestran en la Figura 1, agrupándose en cuatro grupos (GI, GII, GIII, GIV) y la clasificación de calidades sigue la propuesta por ASEBIR (calidades A, B, C y D).

Los ovocitos maduros fueron microinyectados o inseminados. Tras la microinyección, se pasaron a gotas de 20 microlitros de G1 plus v.5 en placas Falcon embriotestadas 60 x 15, para su cultivo individualizado. Los ovocitos inseminados se pasaron a microgotas de G1 a las 3 – 5 horas post-inseminación.

Se valoraron los pronúcleos en microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200) a las 18h post ICSI o post inseminación. Seguidamente, los cigotos fueron cambiados a placas de G1 nuevas, manteniendo su posición de cultivo. Se observó su desarrollo hasta día 2 o día 3, anotando las características de cada embrión (número de células, grado de simetría entre ellas, porcentaje de fragmentos, presencia de multinucleación) para poder clasificarlos según la calidad ASEBIR correspondiente (A, B, C o D).

Para estudiar si se hallaba relación entre la observación de un patrón pronuclear determinado y la calidad ASEBIR, se construyeron tablas de contingencia tanto para día 2 como para día 3, y se aplicó un test chi-cuadrado (mediante el paquete estadístico SPSS v. 17.0).

RESULTADOS

La frecuencia general de patrones pronucleares observados en nuestro laboratorio es la siguiente: 28,2% GI; 42,1% GII; 6,0% GIII; 23,8% GIV.

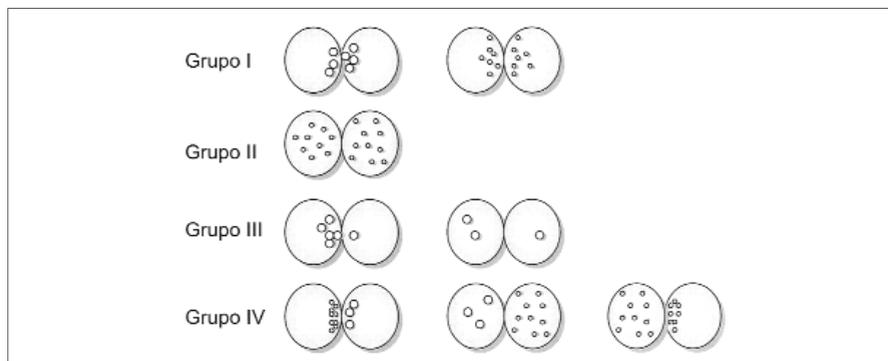


Fig. 1: Clasificación esquemática de los cuatro grupos de cigotos en función del patrón pronuclear.

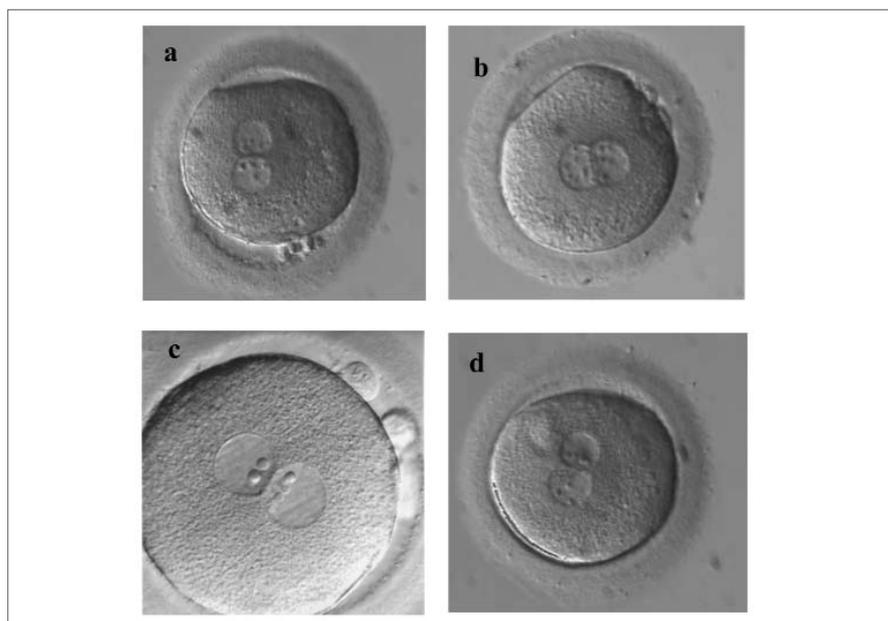


Figura 2: Imágenes ejemplo de los cuatro tipos de patrones pronucleares: GI (a), GII (b), GIII (c), GIV (d). Las imágenes a, b, d, proceden de cigotos obtenidos en nuestro centro; la imagen c procede de "An atlas of human blastocysts" (Lucinda L. Veeck, Nikica Zaninovic).

En embriones cultivados hasta día 2, la distribución general de frecuencias de calidades observadas fue la siguiente: 39,1% calidad A; 20,6% calidad B; 19,6% calidad C; 20,6% calidad D. Para día 3, la distribución general observada

fue: 31,1% calidad A; 14,1% calidad B; 16,8% calidad C; 38,0% calidad D.

Si no hubiera correlación entre el patrón pronuclear observado en día 1 y la calidad embrionaria durante el cultivo

(día 2, día 3), sería de esperar una distribución similar de las frecuencias anteriores cuando se analizara la calidad embrionaria a partir de cada grupo de patrones por separado. Para comprobar si la relación existía se estudiaron las tablas de contingencia para patrón pronuclear vs calidad ASEBIR, las cuales mostraron significación estadística en ambos casos (ver Tablas I y II). Así pues, en nuestro caso, hallamos una relación entre la calidad embrionaria obtenida y el patrón pronuclear.

Del estudio más detallado de las tablas se observa, en los embriones procedentes de cigotos GIII, una tendencia al aumento de la calidad C (27,5% vs. el 19,6% general) en detrimento de la calidad A (27,9% vs. el 39,1% general) para día 2.

Por otro lado, para día 3, se observa mayor proporción de embriones de calidad A (35,6% vs. el 31,1% general), así como de buena calidad (A+B) (52,1% vs. 45,2%), derivados del patrón pronuclear GI, en contraste con el aumento de calidades D derivadas del patrón GIII (47,1% vs. 38,0% general).

De los cuatro grupos de patrones pronucleares, éstos dos son los que muestran una mayor desviación respecto a los valores generales.

DISCUSIÓN

La observación del patrón pronuclear en estadio de cigoto se ha propuesto en varios estudios previos como una de las características predictivas del desarrollo embrionario y de la capacidad implantatoria (Senn et al., 2006; Balaban et al., 2001; Wittemer et al., 2000; Tesarik and Greco, 1999; Tesarik et al., 2000; Scott et al., 2000; Gámiz et al., 2003), a pesar de que no siempre se haya hallado dicha relación (James et al., 2006).

En nuestro centro, los grupos de patrones pronucleares utilizados para clasificar los cigotos nos permiten predecir de manera significativa una distribución distinta de la calidad del embrión celular (día 2, día 3), especialmente en los que derivan de patrones GI (mayor tasa de desarrollo de embriones de calidad óptima) y GIII

		Score ASEBIR Día 2				
		A	B	C	D	
Patrón PN	1	Recuento	411	191	155	208
		% dentro del patrón de PN	42,6%	19,8%	16,1%	21,5%
	2	Recuento	548	312	295	285
		% dentro del patrón de PN	38,0%	21,7%	20,5%	19,8%
3	Recuento	57	49	56	42	
	% dentro del patrón de PN	27,9%	24,0%	27,5%	20,6%	
4	Recuento	323	154	166	172	
	% dentro del patrón de PN	39,6%	18,9%	20,4%	21,1%	
Total		Recuento	1339	706	672	707
		% del total	39,1%	20,6%	19,6%	20,6%

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	27,726 ^a	9	,001
N de casos válidos	3424		

Tabla I: Tabla de contingencia Patrón PN * Score ASEBIR Día 2

		Score ASEBIR Día 3				
		A	B	C	D	
Patrón PN	1	Recuento	218	101	89	205
		% dentro del patrón de PN	35,6%	16,5%	14,5%	33,4%
	2	Recuento	243	117	145	340
		% dentro del patrón de PN	28,8%	13,8%	17,2%	40,2%
3	Recuento	29	16	19	57	
	% dentro del patrón de PN	24,0%	13,2%	15,7%	47,1%	
4	Recuento	160	61	98	191	
	% dentro del patrón de PN	31,4%	12,0%	19,2%	37,4%	
Total		Recuento	650	295	351	793
		% del total	31,1%	14,1%	16,8%	38,0%

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	22,586 ^b	9	,007
N de casos válidos	2089		

Tabla II: Tabla de contingencia Patrón PN * Score ASEBIR Día 3

(mayor probabilidad de desarrollo embrionario de calidad D).

Dado que la valoración del patrón pronuclear en nuestro laboratorio se realiza simultáneamente a la valoración de la fecundación (observación del número de PN y de CP a las 18h post-inseminación o ICSI), y por ello no supone un aumento significativo del tiempo de exposición del embrión fuera del incubador, y, ya que nos permite establecer un pronóstico del desarrollo, sobretodo en el caso de los grupos GI y GIII, consideramos interesante seguir manteniendo este criterio de valoración como otro de los utilizados en la elección de los mejores embriones para transferir.

A pesar de todo, y a diferencia de otros estudios publicados, no se ha valorado la capacidad implantatoria de los embriones derivados de cada grupo de patrones pronucleares, por tratarse de un estudio retrospectivo en el que, a la hora de transferir, no se utilizó el patrón pronuclear como criterio de selección. Un estudio más detallado y dirigido a la predicción de la capacidad implantatoria de un embrión a partir del patrón pronuclear observado sería necesario en nuestro caso.

Otra conclusión que se desprende de la observación de los resultados en el análisis realizado, es que en día 2 se observa mayor porcentaje de embriones de buena calidad (A+B) que en día 3. Esto se debe sobre todo a que, en los casos de transferencias en día 2, los mejores embriones se seleccionan ya sea para transferir, ya sea para su criopreservación, pero no siguen el cultivo hasta día 3. De todos modos, hay otro grupo nada menospreciable de embriones que, siendo de calidad óptima en día 2, no dividen o lo hacen en un grado muy bajo (sólo una división) entre día 2 y día 3, pasando a calidad D. Es posible que esto sea consecuencia de una mala activación del genoma embrionario, que empieza a manifestarse en este momento del desarrollo (en las primeras divisiones el embrión depende del material genético del ovocito). Por esta razón, nuestra elección inicial sería la de transferencia en día 3, pues nos permite seleccionar mejor los embriones.

AGRADECIMIENTOS

A todas las compañeras que han colaborado en este estudio y que, con gran esfuerzo, recopilan los datos necesarios para desarrollar proyectos como éste.

A Lluís Bassas, por su ayuda desinteresada en el tratamiento estadístico de los datos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEBIR – Asociación para el estudio de la biología de la reproducción. II Cuaderno de Embriología Clínica "Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos". 2ª edición, 2008.

Balaban B; Urman B; Isiklar A; Alatas C; Aksoy S; Mercan R et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357 - 2361.

Gámiz P; Romero JL; Zulategui JF; Gadea B; Albert C; de los Santos MJ. Valoración de la fecundación. En: Remohí J., Cobo A., Romero JL., Pellicer A., Simón C. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 2ª edición. McGraw-Hill Interamericana; 2005. p. 392 - 402.

Gámiz P; Rubio C; de los Santos MJ; Mercader A; Simón C; Remohí J et al. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 2413 - 2419.

James, AN; Hennessy S; Reggio B; Wiemer K; Larsen F and Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod* 2006; 21: 1599 - 1604.

Scott L; Alvero R; Leondires M and Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394 - 2403.

Senn A; Urner F; Chanson A; Primi M-P; Wirthner D and Germond M. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2006; 21: 234 - 239.

Tesarik J and Greco E. The probability of

abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318 - 1323.

Tesarik J; Junca AM; Hazout A; Aubriot FX; Nathan C; Cohen-Bacrie P et al. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000; 15: 1396 - 1399.

Veeck LL; Zaninovic N. Overview of human preimplantation development in vitro. En: Lucinda L. Veeck, Nikica Zaninovic. An atlas of human blastocysts. The Partenon Publishing group. p. 37.

Witteimer C; Bettahar-Lebugle K; Ohl J; Rongières C; Nisand I and Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000; 15: 2591 - 2597.



Somos los primeros
en conocerte ...

... y sabemos que
crecerás sano

www.pgdcem.com

SERVICIOS

Servicio de diagnóstico genético preimplantacional:
ovocitos y embriones

¡Novedad!

Estudio de aneuploidías (hasta 24 cromosomas)

Estudio de reorganizaciones cromosómicas

Estudio de enfermedades monogénicas

- > 200 enfermedades hereditarias
- Tipaje HLA
- Tramitación de expedientes para CNRHA
- Consejo genético en el centro FIV

Estudio genético del factor masculino

FISH en espermatozoides

Test de fragmentación del DNA en espermatozoides

Microdeleciones del cromosoma Y

Test CVBA (screening de 30 mutaciones del gen CFTR +
polimorfismo IVS8-Tn)

Otros servicios

Biopsia y procesado de blastómeros y corpúsculo polar
en su propio centro

Formación de embriólogos en técnicas de micromanipulación

CURSO PRÁCTICO DE
IMSI

Período de realización:

Grupo I : 17 de Noviembre 2010

Grupo II : 18 de Noviembre 2010

(plazas limitadas)

**ANALIZAMOS LOS
24 CROMOSOMAS**

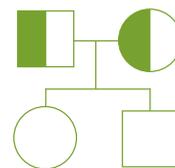
Manteniendo el mismo coste
del PGD.



centro de medicina
embrionaria

www.pgdcem.com

Madrid y Barcelona - España



Reproductive
Genetic
Institute

Chicago - USA

CME Madrid - Medea, 4 · 3ºD Edificio ECU. 28037 Madrid - Tf. 91 411 50 80 - Fax 91 411 50 81

CME Barcelona - Trias i Pujol, 5. 08034 Barcelona - Tf. y Fax 93 280 40 28

pgd@pgdcem.com

El debate del presente número es “Registro SEF 2008”. Las modificaciones recientes a la manera de presentar los resultados de los centros, y la publicación de estos resultados, de los centros que así lo decidan, han generado

una serie de controversias, algunas de las cuales se presentan a continuación. El debate está servido.

En el próximo número de Diciembre, el tema de debate será: “Vitrificación de

oocitos para retrasar la maternidad”.

Os recordamos que los temas de debate son permanentes, con lo cual, podéis opinar sobre ellos en cualquiera de los números.

ES NECESARIO CONSIDERAR LOS INTENTOS PREVIOS

Dolores Pascual Llopis, Francisco Martínez Díaz, Arturo Reyes Palomares, Eva Cogollos Úbeda, Elena del Mar Martín Díaz, Ana Gallego López. Instituto de Fertilidad Clínica Rincón, Málaga.

Desde el Instituto de Fertilidad Clínica Rincón, agradecemos el esfuerzo que está desarrollando la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) para elaborar y poner en marcha este proyecto, en el que nosotros venimos colaborando desde hace algunos años. Nuestra colaboración parte de nuestro propio interés por mantener un registro único, y con ello una excelente referencia con la que marcar la evolución de nuestros tratamientos y técnicas de laboratorio. Consideramos que el registro cumple un papel fundamental de autocontrol para la gran mayoría de centros, y por ello lo percibimos como una labor propia de una sociedad científica como es la SEF. Por esta razón mostramos nuestro interés en continuar con dicha colaboración, de ningún modo por el hecho de hacerse público nos vamos a retractar de esta decisión y aprovechamos para animar al resto de centros para que continúen haciéndolo.

Por otro lado y sin olvidar las consecuencias de que aumente el impacto de la publicación, queremos lanzar fundamentalmente una propuesta de mejora que consideramos muy necesaria, para que se pueda valorar objetivamente los resultados de cada centro. De no ser así por causas ajenas a la buena práctica de unidades y centros, pueden ocasionarse importantes perjuicios económicos que pueden influir en la participación de los centros al registro. Percibimos que tradicionalmente el número de intentos previos en otros centros no se ha tenido en cuenta, probablemente porque no tuviese mucha relevancia o impacto, y ahora ante la nueva condición sí lo tiene por lo que consideramos que debiera urgentemente solventarse. Es muy importante incluir los resultados en función de intentos previos en otros centros y en el mismo centro, se hace ineludible cuando consideramos de

forma conjunta el ámbito privado y el público teniendo una cobertura muy distinta por factores tan diversos como son la edad, económicos, social o familiar y cualquier otro de los motivos que afecten. Con lo que queremos hacer resaltar la importancia de evitar la creación de un ranking de centros que pueda afectar negativamente sobre la actividad profesional que desarrollamos. Por otro lado queremos recordar la importancia de que se agilice la creación del ya anunciado registro unificado de donantes, que también puede influir directa o indirectamente en la transparencia de los resultados emitidos. Somos conscientes del impacto que generará la publicación de nuestros resultados y por ello nos preocupamos de que al menos sea provechoso el cambio sin perjuicio de una interpretación errónea de los resultados.

AUDITORÍAS PARA EL 100% DE LOS CENTROS

M^a Josepa Mulet Mallafrè
BIOGEST. Centre de Reproducció Humana, Tarragona.

En nuestra opinión la idea de apostar por la transparencia en el registro de la SEF nos parece muy correcta y acertada ya que todos hemos visto tasas de embarazo en congresos o en páginas Web completamente maquilladas.

En cuanto a que una auditoria externa pueda comprobar los datos que se presentan, pensamos que es necesario. Es más, nos parece poco que solo un 10% de los centros sean auditados y no nos parece bien que si se detecta algún error en la auditoria, simplemente no se publiquen los datos de este centro.

Pensamos que en este caso, obligatoriamente, se deberían de publicar los datos una vez corregidos.

Otro tema relacionado con la transparencia es la identificación de cada centro participante con su nombre y dirección, aquí es donde se arma el revuelo. Creemos compartir nuestra opinión con la de otros centros privados, que este hecho nos puede afectar económicamente y portanto entendemos que la Dirección de cada centro, cuya misión es asegurar su continuidad, quiera eliminar este peligro.

Todos sabemos que hay una cierta variabilidad con los resultados y si un año tus resultados son peores que los de un centro cercano, podrías notar un decrecimiento en el acceso de pacientes. Es más, habrás conseguido una “fama” que costará trabajo subsanar.

Por tanto en nuestra opinión: Auditorias sí, cuantas más mejor, a ser posible el 100% e identificación de los centros participantes mediante un código.

TRANSPARENCIA NO SIEMPRE ES SINÓNIMO DE HONESTIDAD

Adoración Rodríguez Arnedo, Ana M^a Fabregat Reolid, Anna Rabanal, Antonio Urbano Carrillo, Arantza Farreres, Arturo Brassesco Macazzaga, Barbara Freijomil, Belén Lledó Bosch, Belén Murillo Guibert, Carlos García-Ochoa del Fresno, Carmen Calatayud Lliso, Carmen Puyo Gómez, Carolina Castelló, Cristina Puche, Elsi Suárez Álvarez, Empar Ferrer Robles, Esther Velilla, Felipe del Rio Bueno, Florentino Garrido González, Francisco Avila Suarez, Francisco de Asís Vergara Alcaide, Gemma López Granollers, Ignacio Santiago Alvarez Miguel, Jaime Guerrero Villena, Joan Massó, Jorge Ten Morro, José Ramón Ortiz de Galisteo, Juan Manuel Moreno García, Laia Echevarría, Lara Mencía, Laura Gil Aliaga, Laura Jimenez Díez, Luz M. Rodríguez Menes, M^a Ángeles Carracedo Caballero, M^a Dolores Casasús Bernabeu, M^a Dolores Pérez Izquierdo, Margarida Gelabert Altayó, María Vila Marqués, Mario Brassesco Macazzaga, Marta Asensio, Marta Sala, Marta Valiente, Meritxell Rafael Palou, Miguel Ruiz Jorro, Minerva Ferrer i Buitrago, Mireia Domínguez Vega, Mireia Poveda García, Natalia Perez Vallés, Nieves Toledo Riera, Nuria Fosas Saenz, Nuria García Potrony, Olga Cairó Doncos, Paloma Duque Alvarez, Paula Fernández, Pilar Martín Talavera, Rafael Lafuente Varea, Ruth Alcolea Belloso, Ruth Morales Sabater, Sara González García, Sergi Rovira Fontanals, Silvia Fernández, Sonia Gili Bonet, Sonsoles Rodríguez Fiestas, Teresa Rubio Asensio, Víctor Masedo García.

ANACER

La Asociación Nacional de Clínicas de Reproducción Asistida (ANACER), que agrupa a 25 clínicas privadas distribuidas por todo el territorio nacional, a través de un comunicado, expresaba su preocupación y rechazo hacia la forma en que la SEF ha abordado el tema del REGISTRO este año.

Nosotros como asociados de ASEBIR, también queremos hacernos eco de esa preocupación, utilizando este espacio para hacer llegar nuestras inquietudes sobre el Registro SEF 2008.

Los abajo firmantes pensamos que la trascendencia que tiene la llamada "transparencia" del registro, tendría que haber llevado a la Junta Directiva de la SEF a presentarla, discutirla y aprobarla en una Asamblea General de Socios antes de proponerla al Ministerio.

Por otro lado, nos llama la atención, que después de tantos años esforzándonos en enviar de forma voluntaria nuestros resultados, de pronto, su impulsor, la SEF, sospeche de la veracidad de los mismos. De hecho, se atreve a apoyar lo que piensan otros de nuestro quehacer profesional al decir que "los Registros europeo y mundial prefieren menos ciclos recogidos en España pero de más calidad". ¿Es que la SEF no tiene nada que decir al respecto de su registro o es que piensa también que los datos obtenidos y publicados hasta ahora no son correctos? ¿Cómo pueden pensar que unas técnicas que venimos desarrollando desde hace décadas con gran prestigio en todo el mundo se pongan ahora en entredicho?

Si piensan que hay Centros realizando una publicidad engañosa de sus datos, que sea el Ministerio o la Consejería de Sanidad de su Comunidad Autónoma, la que se encargue de comprobarlo y no una sociedad científica, la cual debe estar preocupada por otros temas más importantes como podrían ser el promover las transferencias únicas, el seguimiento de los niños nacidos por TRA, entre otros muchos.

Es curioso como la SEF se escuda al decir que estamos practicando una medicina paternalista, al indicarles la dificultad que van a tener los pacientes para poder entender adecuadamente los resultados que se les van a ofrecer, cuando todos sabemos que de la información que recibirán sólo se fijarán en un dato, la tasa de embarazo.

La consecuencia de esto será que Centros que están trabajando correctamente, con indicaciones no siempre favorables; malas respondedoras, fallos de implantación, factores masculinos severos, etc, y que lógicamente sus tasas de embarazo/ciclo van a ser menores, verán también disminuidos sus ciclos en el próximo año e incluso con pérdida de puestos de trabajo porque, se supone, embarazan menos. Esto es lo más preocupante y trascendente de la "transparencia" del Registro, que los centros, por el temor a "poner en peligro sus resultados" puedan verse inducidos a no aceptar este tipo de pacientes, incluso transferir un mayor número de embriones que los que vienen transfiriendo hasta ahora, lo que presumiblemente llevará a un aumento de embarazos múltiples e incluso de reducciones embrionarias.

En cuanto a la posibilidad del fraude, siempre fue y será una posibilidad más, pero ahora sí tendrá trascendencia. Es difícil de aceptar que solo se audite a un 10% de los Centros. ¿Cómo se puede asegurar a los socios, que los Centros que presentan los ciclos son todos los ciclos que realizan y no solo los que les lleven a tener los "resultados óptimos"? ¿Cómo el auditor va a llegar a esa conclusión si solo va a auditar los datos que se le presenten? A estas preguntas se contestó en el Workshop sobre el Registro, "que había que confiar en la honradez del científico" Realmente si se piensa en la honradez, no hacía falta esa auditoría.

En el nuevo registro, nos piden, entre otros datos, el nº de ciclos de pacientes extranjeras que realizamos. ¿Cuál es el fin? Podemos deducir, que esto tiene otros intereses diferentes a los que proponen y seguramente habrá más de un país extranjero esperando saber cuántas de sus pacientes se facturan en España para buscar la forma de rescatarlas.

En definitiva, nos adherimos a la opinión expresada por ANACER. Queremos un Registro honesto pero, por lo expuesto anteriormente, pensamos que transparencia no siempre es sinónimo de honestidad. Deseamos un Registro SEF donde podamos comparar nuestros resultados como veníamos haciendo hasta ahora sin falta que nos fiscalicen. A nuestro juicio, nos hemos cargado un Registro del que empezábamos a estar orgullosos.



Everything
you need for
successful IVF.

From aspiration to transfer

We offer a product portfolio that covers all steps of an IVF-treatment. For you that means an unbroken chain of quality products with the same perfectionist

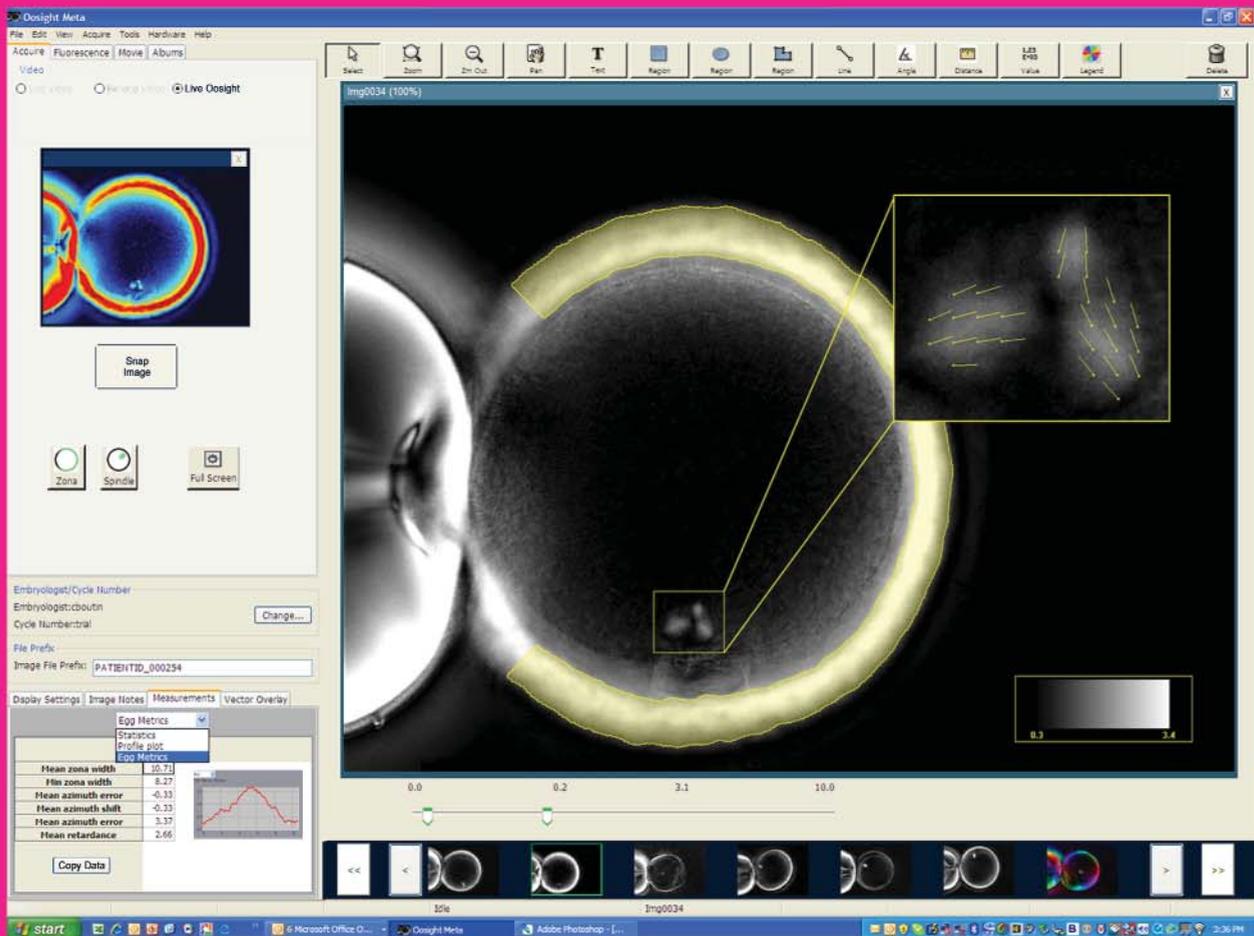
approach all the way. The benefits are clear - we help you achieve great results with guaranteed reliability throughout the whole process.



www.embiol.com



Oosight. The non-invasive imaging system that reveals critical structures in the oocyte to **enable better grading.**



LA NUEVA VÍA DEL REGISTRO DE ACTIVIDAD DE LA SEF: EL AUMENTO DE LA CALIDAD

José Luis Gómez Palomares¹, Yolanda Cabello², Juana Hernández³, Sylvia Fernandez-Shaw⁴, Esther Vidal⁵, Julio Herrero⁶, Francisca Luceño⁷, Javier Marqueta⁸, José Antonio Castilla⁹, Buenaventura Coroleu¹⁰

¹FivMadrid, ²Fiv Recoletos Madrid, ³Hospital San Millán, Logroño, ⁴Unidad de Reproducción Humana García del Real de Madrid, ⁵Hospital Universitari Clínic de Barcelona, ⁶Centro de Reproducción Asistida Sagrada Familia de Barcelona, ⁷Centro de Reproducción Humana de Granada, ⁸Instituto Balear de Infertilidad, Ginecología y Reproducción, ⁹Hospital Universitario Virgen de la Nieves, ¹⁰Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

Los cambios que el Registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) ha sufrido en la edición 2008 son, quizás, los más trascendentes que ha experimentado hasta ahora. Esto se debe a la entrada de un nuevo "colaborador" en escena: el Ministerio de Salud y Política Social.

El acuerdo suscrito con el Ministerio supone que los datos del Registro se seguirán enviando al ministerio de forma agregada, sin distinguir por centros, tal y como hasta ahora se venía haciendo, pero, y ésta es la novedad, se entregará un resumen detallado centro por centro de los datos de actividad más relevantes, que se harán públicos en la página de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA). Es decir, por primera vez en la historia del Registro, se harán públicos algunos datos de cada centro, siempre y cuando éstos lo autoricen. La controversia está servida, pero creemos que esto es sumamente positivo y ha redundado en un aumento significativo en la calidad del registro.

En años anteriores, y durante el periodo en el que el registro estaba abierto al envío de datos, ningún miembro del Comité del Registro podía conocer los datos que los centros remitían de forma individual. Tan sólo se entregaba el informe anual de datos agregados. Este hecho ha cambiado en la presente edición, y sí ha sido factible conocer los datos de cada centro, siempre y cuando se hubiera marcado la casilla aceptándolo. El objeto de acceder a los datos ha sido evitar que pasen al registro errores involuntarios. A este proceso lo llamamos "filtración" y a él fueron sometidos la totalidad de los centros que dieron su conformidad para participar.

La totalidad de los centros implica la revisión de la totalidad de los cuadernos de recogida de datos enviados. Los centros fueron informados de los errores hallados para que hicieran las modificaciones oportunas. Esto no ocurría en ediciones previas. Ha sido aquí donde se ha comenzado a percibir cuan positivo puede ser la supervisión del envío de resultados. Es aquí donde se refleja, ya, el aumento en la calidad del registro. Pero, además, se ha dado un paso más: la monitorización "in situ".

El acuerdo suscrito con el Ministerio supone comprobar la veracidad de los datos de, al menos, el 10% de los centros que hayan suministrado previamente los datos de actividad. Se ha hecho en el 17%. A este proceso se le ha denominado Monitorización y ha sido realizado por una monitora de ensayos clínicos cualificada. Las monitorizaciones han consistido en visitas presenciales realizadas en el propio centro, para verificar el máximo de historias clínicas, atendiendo especialmente a los ciclos cancelados, a las gestaciones y a los partos.

En la presente edición han participado 119 centros, 104 de IU y 97 en FIV/ICSI. Tres centros de FIV/ICSI fueron eliminados antes de la aleatorización, por aportar datos no válidos. Se seleccionaron de forma aleatoria para la monitorización 16. De estos 16, en 2 no se pudo realizar la monitorización, por lo que fueron también eliminados del Registro de este año. Finalmente, se visitaron 14 centros. En uno de ellos la monitorización no fue satisfactoria, por lo que tampoco será incluido en el Registro 2008. Quedaron 91 centros, de los que uno se eliminó por dar datos agrupados de varios centros. En esta

segunda fase se han eliminado datos que, de no haber sido revisados, habrían sido admitidos como probablemente haya ocurrido en ocasiones anteriores. ¿No es obvio que la calidad de lo que se computa es mayor?

Pero no sólo creemos que los cambios introducidos aumentan la validez del Registro, sino que además:

1. Al poner al servicio de las parejas un registro público, estamos facilitando su toma de decisiones, ya que, al contrario que en otras parcelas de la medicina, la mayoría de las pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida deben escoger centro para tratarse pues pertenecen al sector privado.
2. Se pone de manifiesto la voluntad de la SEF de colaborar plenamente con las administraciones sanitarias en la elaboración de un registro oficial público validado.
3. Se aumenta la credibilidad de los centros participantes ante pacientes, organismos, e instituciones nacionales e internacionales.
4. Un registro transparente permitirá tener datos válidos para conocer la eficacia de los tratamientos y controlar aquellos procedimientos que conlleven un aumento de la morbilidad de los recién nacidos (embarazos múltiples).
5. Adelantarnos a otras instituciones o colectivos en esta demanda social, que tarde o temprano llegará, especialmente en una sociedad de la información como la actual, nos permitirá marcar la pauta y ganar experiencia en la gestión de este tipo de registros.

6. El poner a disposición de nuestros pacientes un registro transparente nos permitirá abrir canales de comunicación con el público en general e iniciar una serie de medidas encaminadas a una adecuada interpretación de resultados de las técnicas de RA, que evitará las confusiones actuales en la interpretación de los resultados.

Pero los cambios introducidos también han supuesto un coste. El más evidente ha sido el descenso del número de ciclos registrados. La disminución ha sido del 23,9% en FIV/ICSI (26.246 ciclos en 2008 frente a 34499 en 2007) y del 19,2% en inseminación (23.295 en 2008 frente a 28.834 en 2007). Menos datos pero de más calidad. Una disminución que, seguro, se reducirá en la próxima edición.

El esfuerzo que la SEF y, en concreto, el Comité del Registro, ha realizado ha sido enorme. Pero todo es susceptible de mejora. El comité del Registro está abierto a cualquier sugerencia a través de su web (www.registrosef.com) y su blog (<http://registrosef.wordpress.com/>).

Se puede dar el primer paso de otra forma, pero no con mejor intención. Por eso, apoyos tan importantes conseguidos como el de diferentes sociedades científicas (ASEBIR, ASESAs, SEGO), respaldando todas las actuaciones que el Comité del Registro ha llevado a cabo, no hacen más que reconocer la validez de esta nueva vía hacia conseguir el definitivo registro oficial de técnicas de reproducción asistida.



REPROGENETICS

COMPROMETIDOS
CON LA
INNOVACIÓN
EN DGP

DIRECTORES CIENTÍFICOS

Mireia Sandalinas - Carles Giménez

ANÁLISIS DE TODOS LOS CROMOSOMAS MEDIANTE ARRAY CGH (aCGH24)

REPROGENETICS SPAIN
pgdteam@reprogenetics.es
+34 93 241 77 24

IMPRONTA GENÓMICA Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA *IMPRINTING AND ASSISTED REPRODUCTION*

Cristina Camprubí

Grupo de Investigación Impronta genómica y Cáncer · Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC)

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

E-mail: ccamprubi@idibell.cat

RESUMEN

La impronta genómica es una marca epigenética específica de alelo que regula la expresión de determinados genes del genoma en función de su origen parental, conllevando su expresión monoalélica. El término epigenética hace referencia a cambios heredables que no implican modificaciones en la secuencia del DNA. Estos cambios corresponden a la metilación del DNA y a modificaciones de las proteínas histonas. La impronta genómica se establece durante la gametogénesis y debe mantenerse después de la fecundación para el correcto desarrollo embrionario. En los últimos años, numerosos trabajos han correlacionado anomalías en la impronta genómica con la aplicación de técnicas de reproducción asistida o con la infertilidad. Profundizar en este área de conocimiento contribuirá en mejorar tanto el éxito como la seguridad de estas técnicas. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2010; 15(1):36-41.

Palabras clave: Impronta genómica, Epigenética, Reproducción asistida

ABSTRACT

Imprinting is an allelic-specific epigenetic mark that controls certain genes expression on the basis of the parental origin resulting in monoallelic expression. Epigenetics refers to heritable changes that do not involve modifications in the DNA sequence. These changes correspond to DNA methylation and histone modifications. Imprinting is established during gametogenesis and it must be maintained after fertilization for proper embryo development. In the last years several reports correlate imprinting abnormalities with assisted reproduction techniques or with infertility itself. The increase of knowledge of this field will contribute to improve the success and safety of these technologies. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2010; 15(1):36-41.

Key words: Imprinting, Epigenetics, Assisted reproduction

Desde el nacimiento de Louise Brown a finales de los años 70, el desarrollo y aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA) ha permitido superar muchos casos de infertilidad. Sin embargo, considerando su impacto social, cabe plantearse si la investigación básica asociada a las TRA avanza de forma sincrónica a su aplicación, con el objetivo de incrementar el conocimiento de la biología de gametos y embriones procedentes de la población infértil, aportando así información de gran relevancia que permita, tanto mejorar el éxito del ciclo de reproducción, como garantizar la seguridad para la descendencia.

En el área de la genética humana se ha observado un incremento de individuos portadores de anomalías cromosómicas constitucionales (de Braekeleer and Dao, 1991), de anomalías meióticas (Egozcue et al., 1983) o de gametos

cromosómicamente desequilibrados (Arán et al., 1999; Vegetti et al., 2000; Rubio et al., 2001) en poblaciones de individuos con problemas de fertilidad. El estudio del cariotipo de la pareja, el diagnóstico genético preimplantacional y estudios citogenéticos en células germinales, permiten ofrecer consejo genético y acotar el riesgo de que la descendencia pueda heredar anomalías cromosómicas o genéticas, en el caso de que alguno de los progenitores sea portador de anomalías cromosómicas o monogénicas, en casos de abortos de repetición o edad avanzada, o en casos en los que existe un bloqueo meiótico causado por un incremento de anomalías cromosómicas en las células germinales.

Mientras que los riesgos genéticos cada vez están más acotados, en la actualidad la investigación también se centra en elucidar si existen riesgos epigenéticos asociados a la aplicación de TRA.

Epigenética e impronta genómica.

El término epigenética se refiere a cambios heredables que no implican variaciones en la secuencia de nucleótidos en la molécula de DNA, pero sí regulan la expresión génica. Estos cambios incluyen la metilación del DNA en el carbono 5 de las bases citosina en dinucleótidos CpG y modificaciones postraduccionales en los extremos N-terminales de las histonas. Estas modificaciones covalentes actúan conjuntamente modificando la conformación de la cromatina. El DNA de células eucariotas se encuentra empaquetado mediante la formación de nucleosomas que consisten en 146 pares de bases de la molécula de DNA, organizadas alrededor de un octámero de 4 proteínas histonas (H2A, H2B, H3 y H4). Dependiendo del estado de metilación del DNA, así como de modificaciones represoras o activadoras de las proteínas histonas

(principalmente metilaciones y acetilaciones en aminoácidos lisina), la cromatina adopta una conformación cerrada (heterocromatina) o abierta (eucromatina) (Figura 1). La conformación de la cromatina en forma de heterocromatina se asocia a represión génica, dado que el DNA es inaccesible a la maquinaria de transcripción, mientras que la conformación en forma de eucromatina se asocia a expresión génica.

Surani y colaboradores y McGrath y Solter crearon embriones murinos ginogenéticos y androgenéticos, es decir, embriones con dos pronúcleos o genomas maternos o con dos pronúcleos o genomas paternos, respectivamente (Surani et al., 1984; McGrath and Solter, 1984). La presencia del genoma materno y paterno implica el desarrollo de un embrión y tejidos trofoblásticos normales. En cambio, los embriones ginogenéticos crecen relativamente

Beckwith-Wiedemann y de Silver-Russell, que pueden ser causados por DUP paterna del cromosoma 11 y DUP materna del cromosoma 7, respectivamente (Eggermann et al., 2008). Es también ampliamente conocido que DUP del cromosoma 14 causa diferentes fenotipos de crecimiento anómalo, dependiendo del origen de la DUP (Murphy et al., 2003).

En resumen, determinadas anomalías fenotípicas pueden ser causadas por la herencia de dos copias maternas o paternas de determinados genes, manifestando la presencia de genes con un comportamiento específico de alelo y su relevancia en el desarrollo. Además de DUP, anomalías epigenéticas que conllevan la expresión bialélica (ausencia de metilación en ambas copias) o no expresión (presencia de metilación en ambas copias) de genes regulados por impronta genómica, pueden resultar no sólo en el desarrollo de síndromes y anomalías del crecimiento, sino también en el desarrollo de cáncer, diabetes neonatal transitoria (Temple, 2007) y pseudohipoparatiroidismo (Bastepe, 2008), dependiendo del gen o genes afectados. Considerando la función de determinados genes regulados por impronta genómica en el desarrollo cerebral y fetal, la etiología del autismo y de la esquizofrenia (Badcock and Crespi, 2006) así como la preeclampsia (Enquobahrie et al., 2008), la restricción del crecimiento intrauterino (McMinn et al., 2006; Diplas et al., 2009) y el bajo desarrollo para la edad gestacional (Guo et al., 2008) han sido relacionados con anomalías en la impronta genómica.

Actualmente se conocen aproximadamente 60 genes regulados por impronta genómica en humanos, mapados en diversos cromosomas. Cabe comentar que los genes regulados por impronta genómica suelen encontrarse agrupados en dominios cromosómicos formando un cluster de genes. La expresión monoalélica de todos los genes agrupados en un determinado dominio, se encuentra bajo el control de una única región, denominada centro regulador de la impronta (Imprinting Control Region; ICR). Las ICR del genoma se corresponden con lo que se conoce

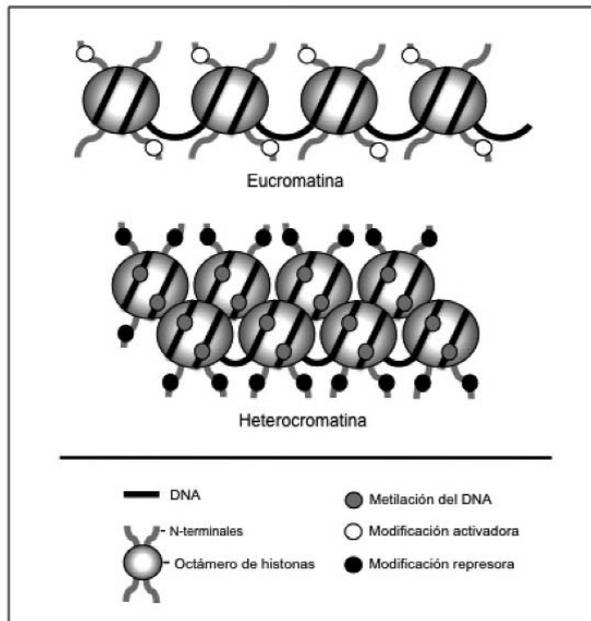


Figura 1. Esquema de las modificaciones epigenéticas en el DNA y en las proteínas histonas relacionadas con el estado de la cromatina en forma de eucromatina o heterocromatina.

El término epigenética engloba la impronta genómica, un sistema de regulación de la expresión génica, presente en especies de gestación intrauterina (Das et al., 2009), que consiste en marcar diferencialmente, mediante modificaciones epigenéticas, determinados genes en función de su origen parental, de manera que sólo se expresa el alelo materno o paterno. Considerando el comportamiento diferencial de alelo de estos genes, la impronta genómica es, junto con los caracteres ligados a los cromosomas sexuales y a los genes mitocondriales, una de las excepciones al principio mendeliano básico de equivalencia, el cual describe la inexistencia de diferencias en el comportamiento de los genes de origen paterno y materno.

Las primeras evidencias de la existencia de impronta genómica surgieron de los resultados obtenidos en experimentos de transferencia nuclear. En 1984,

bien, pero los tejidos trofoblásticos (la placenta) son atróficos. En el caso de los androgenéticos, los embriones apenas se desarrollan aunque las placentas son de gran tamaño (Surani et al., 1984; McGrath and Solter, 1984). La conclusión inmediata frente a estos resultados es que la contribución genética paterna es primordial para el desarrollo de la placenta y la materna lo es para el correcto desarrollo embrionario.

Otra evidencia de la existencia de impronta genómica proviene del hecho de que disomías uniparentales (DUP) de ciertos cromosomas tengan como consecuencia el desarrollo de síndromes o anomalías del crecimiento. Este es el caso de los síndromes de Prader-Willi y Angelman, que pueden ser originados por DUP materna o paterna del cromosoma 15, respectivamente (Cassidy and Schwartz, 1998; Cassidy et al., 2000) y de los síndromes de

como región diferencialmente metilada (Differentially DNA-Methylated Region; DMR). Estas regiones del genoma contienen islas CpG (regiones con un alto contenido de CpG) y son en las que se establece la metilación del DNA y las modificaciones represoras de histonas que conllevan la heterocromatinización de toda la región de forma específica de alelo.

Herencia epigenética y de la impronta genómica

Después de la fecundación, el cigoto resultante hereda la copia materna y paterna de todos los genes del genoma, los cuales deben transmitirse de forma fiel a lo largo de la posterior proliferación celular, asegurando que todas las células del organismo compartan la misma información genética. Para el desarrollo es también imprescindible la diferenciación celular. Del hecho de que células genéticamente idénticas sean tan diferentes funcional y morfológicamente, es responsable la epigenética, la cual regula la expresión o represión de unos u otros genes del genoma en función del tipo celular. Por ello, después de la fecundación y durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, los patrones epigenéticos específicos de ovocito y espermatozoide son eliminados mediante una desmetilación global de ambos genomas. En el estadio de blastocisto, emergen los patrones epigenéticos específicos de cada tipo celular (Figura 2A). Estos patrones deben ser transmitidos a través de la mitosis, para conservar el estado de diferenciación y funcionalidad en las células hijas.

A pesar de la flexibilidad epigenética, que permite la diferenciación celular, los patrones epigenéticos que controlan la expresión monoalélica de genes regulados por impronta genómica son, en términos generales, comunes en todos los tipos celulares, y es especialmente crucial que se mantengan desde la fecundación y a lo largo de las primeras etapas de la embriogénesis, para el correcto desarrollo del embrión, de los tejidos extraembrionarios y para el correcto desarrollo neurológico (Figura 2A). Por lo tanto, la metilación diferencial de alelo de los genes

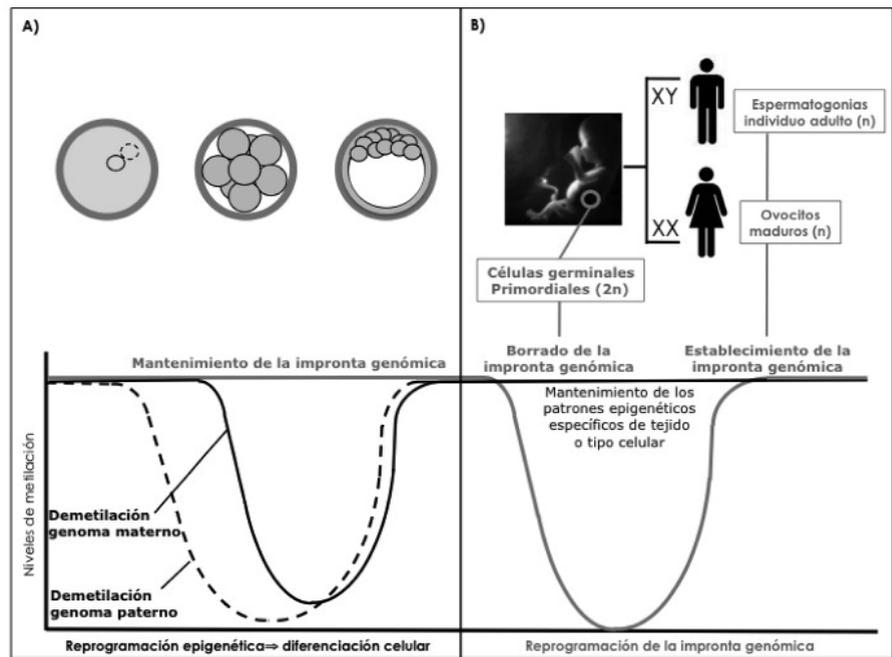


Figura 2. Reprogramación epigenética durante los primeros estadios del desarrollo embrionario (A) y de la impronta genómica en la línea germinal (B). En negro se indican los niveles de metilación global del genoma y en gris los niveles de metilación de los genes regulados por impronta genómica.

regulados por impronta genómica debe ser heredada de ovocitos y espermatozoides, y debe mantenerse o protegerse frente a la desmetilación global que permite la reprogramación epigenética del genoma. Para asegurar la transmisión de la metilación monoalélica de estos genes, existe el mecanismo de reprogramación de la impronta genómica en la línea germinal (Figura 2B). Este ciclo de reprogramación evita que el 50% de los gametos haploides, procedentes de las células germinales primordiales diploides, sean portadores de la copia metilada y el otro 50% sean portadores de la no metilada. Frente a esta situación, un ovocito portador de la copia metilada de un determinado gen regulado por impronta genómica, podría ser fecundado por un espermatozoide también portador de la copia metilada, de modo que el cigoto resultante sería portador de una anomalía en la impronta genómica dado que ambas copias del gen se encontrarían inactivas o silenciadas, conllevando a posibles anomalías del desarrollo. Del mismo modo, si un ovocito portador de la copia no metilada fuera fecundado por un espermatozoide también portador de la copia no metilada, el cigoto resultante expresaría ambas copias del gen, hecho que también se correlaciona con una anomalía en la impronta genómica, con

consecuencias fenotípicas. Para evitar esta situación, en las células germinales primordiales la impronta genómica se borra, y se establecen los patrones de metilación específicos de alelo de los genes regulados por impronta genómica durante la gametogénesis, en función del sexo. Así, aquellos genes en los que su patrón de impronta se correlaciona con metilación materna, establecerán dicha metilación durante la ovogénesis, en función del sexo. El establecimiento de la impronta materna se realiza durante la maduración ovocitaria (Sato et al., 2007), habiéndose considerado por algunos autores que ésta no se completa hasta el momento de la fecundación o justo después de ésta (El-Maarri et al., 2001). En el caso de los genes en los que su patrón de impronta se correlaciona con metilación paterna, ésta se establecerá durante la espermatogénesis, siendo completa en las espermatogonias del individuo adulto (Kerjean et al., 2000). De este modo, todos los ovocitos y espermatozoides serán portadores de la impronta específica de alelo para cada uno de los genes regulados por impronta genómica, asegurando la herencia de un patrón normal de metilación de una de las dos copias de estos genes, y, por ende, asegurando su posterior expresión monoalélica durante el desarrollo.

Impronta genómica y técnicas de reproducción asistida

Tanto la metilación del DNA como las modificaciones en las proteínas histonas son susceptibles de presentar alteraciones que pueden ser consecuencia de: factores genéticos (anomalías en los genes que codifican factores implicados en el establecimiento y/o mantenimiento de la metilación) (Zetterberg et al., 2003; Park et al., 2005; Lee et al., 2006; Zogel et al., 2006; Kobayashi et al., 2009); factores ambientales intrauterinos (Lim et al., 2010); exposición a toxinas (Anway and Skinner, 2008); tratamientos hormonales (Pathak et al., 2008, 2010); diferencias dietéticas (Chmurzynska, 2010).

El conocimiento sobre los mecanismos y las etapas de establecimiento de la impronta genómica, junto con la aparición de datos epidemiológicos que relacionan un moderado incremento en el riesgo del desarrollo de síndromes relacionados con anomalías en la impronta genómica en la población de niños concebidos mediante reproducción asistida (Cox et al., 2002; Ørstavik et al., 2003; Maher et al., 2003; Gicquel et al., 2003; DeBaun et al., 2003), ha focalizado la atención de especialistas en epigenética e impronta genómica en la investigación relacionada con la reproducción asistida. En todos los casos descritos en estos estudios epidemiológicos, la causa del síndrome es la pérdida de metilación (Loss of Imprinting -LOI-) en el alelo materno.

Cultivo in vitro de embriones, hiperestimulación ovárica y maduración in vitro de ovocitos

La aplicación de TRA implica mayoritariamente la fecundación y el desarrollo embrionario temprano en condiciones in vitro, siendo omitido del proceso el ambiente uterino. Existen múltiples datos experimentales obtenidos de modelos animales, que avalan una relación entre el cultivo in vitro de embriones, así como la composición de los medios de cultivo y la transferencia embrionaria en condiciones de asincronía con el estado uterino, y el desarrollo del síndrome de

sobrecrecimiento, conocido como Large offspring syndrome (LOS) y causado por anomalías en genes regulados por impronta genómica (Young et al., 1998; Sinclair et al., 2000; Young et al., 2001; Mann et al., 2004; Li et al., 2005). Además de los efectos fenotípicos inmediatos, debe considerarse la posibilidad de que el cultivo in vitro pueda tener efectos a largo plazo. En este contexto, se ha descrito una relación entre el desarrollo de obesidad, ansiedad y déficit de memoria asociados a anomalías en la impronta, en descendencia obtenida mediante cultivo in vitro en el modelo murino (Fernández-Gonzalez et al., 2007).

Cabe mencionar que en embriones murinos obtenidos por transferencia intrauterina de cigotos obtenidos in vivo, también se han descrito LOI, concretamente en tejidos extraembrionarios. Estas anomalías se intensifican y están presentes, no solo en los tejidos extraembrionarios sino también en el embrión, cuando los embriones son cultivados in vitro antes de su transferencia (Rivera et al., 2008). Este hecho plantea que, así como la manipulación de embriones previa a su implantación puede tener un efecto deletéreo sobre el mantenimiento de la impronta genómica per se, la práctica metodológica común en ambos casos es la hiperestimulación ovárica.

En la práctica habitual de técnicas de reproducción asistida, es complicado aislar la exposición a hormonas, que a su vez conlleva la maduración de múltiples ovocitos inducida por el tratamiento hormonal, y el posterior cultivo embrionario. Considerando que el período de establecimiento de la impronta genómica materna es coincidente con la maduración de los ovocitos, es lógico plantearse que tanto la hiperestimulación ovárica como la maduración in vitro de ovocitos también puedan influir en la impronta, en este caso en su establecimiento. En el año 2007, Sato y colaboradores presentaron un estudio de metilación de diversos genes regulados por impronta genómica, realizado en ovocitos de ratón y humanos en diferentes estados de maduración y en ovocitos madurados in vitro. En el caso de los ovocitos humanos, los autores analizaron tanto

ovocitos inmaduros procedentes de exámenes laparoscópicos de población, así como ovocitos en diferentes estados de maduración obtenidos mediante hiperestimulación de pacientes infértiles (Sato et al., 2007). Sus resultados apuntan de forma consistente la presencia de LOI de diversos genes regulados por impronta, que correlacionan tanto con la hiperestimulación ovárica como con la maduración in vitro de ovocitos. Además, en un estudio reciente del efecto de la hiperestimulación en la impronta genómica, realizado en modelo murino, se ha descrito un efecto dosis-dependiente sobre la metilación del DNA, no sólo en forma de pérdida de metilación sino también por la presencia de metilación aberrante en el alelo materno en genes en los que la metilación se establece en el paterno (Market-Velker et al., 2010). A pesar de ser resultados concluyentes y que en modelo murino queda excluido el componente infértil, éste no debe ser excluido en humanos como consecuencia de la presencia de anomalías en la impronta genómica.

Infertilidad y anomalías en la impronta genómica

Del mismo modo en que anomalías genéticas o cromosómicas explican casos de bloqueo meiótico, anomalías en la impronta genómica pueden explicar casos de infertilidad idiopática.

Este planteamiento no puede ser demostrado experimentalmente en el caso de la meiosis femenina, por la limitación de obtener ovocitos sin hiperestimulación. Aún así, a partir de datos epidemiológicos obtenidos de madres de pacientes con síndrome de Angelman, causado por ausencia de metilación materna, Ludwig y colaboradores demostraron una correlación entre infertilidad y la presencia de estas anomalías (Ludwig et al., 2005). En el caso de la meiosis masculina, han sido publicados múltiples trabajos experimentales confirmando la relación entre la presencia de anomalías en la impronta y oligo-, terato- y astenozoospermia (Marques et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Marques et al., 2008, 2009; Kobayashi et al., 2009; Boissonnas et

al., 2009; Poplinsky et al., 2009; Hammoud et al., 2009). Cabe apuntar que, a pesar de que los resultados de estos trabajos avalan con claridad la presencia de anomalías en la impronta e infertilidad, en la mayoría de ellos no se incluyen poblaciones control de referencia, por lo que dicha relación podría tener una menor incidencia que la descrita hasta la actualidad en la literatura. Si la presencia de este tipo de anomalías en espermatozoides de individuos infértiles fuera tan elevada como la sugerida en estos trabajos, cabría esperar una mayor incidencia de síndromes causados por anomalías en la impronta paterna en la descendencia concebida mediante técnicas de reproducción asistida. Contrariamente, no existen datos epidemiológicos que apunten a un incremento en la incidencia de estos síndromes causados por anomalías paternas, a diferencia de los datos que sí apuntan a un incremento moderado de síndromes causados por anomalías maternas. Sin embargo, y teniendo en cuenta que los genes paternos contribuyen mayoritariamente al desarrollo de tejidos extraembrionarios, resulta atractivo plantear la hipótesis de que las anomalías presentes en espermatozoides de individuos infértiles puedan ser, o bien más deletéreas para la implantación y/o gestación, o bien puedan quedar confinadas a la placenta y verse reflejadas en una mayor incidencia de restricción del crecimiento uterino, consecuencia de una transferencia limitada o anómala de nutrientes de la madre al feto. Será interesante aportar datos experimentales que contribuyan a confirmar o rehusar esta hipótesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anway MD, Skinner MK. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(1):23-25.
- Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999; 72:696-701.
- Badcock C, Crespi B. Imbalanced genomic imprinting in brain development: an evolutionary basis for the aetiology of autism. *J Evol Biol* 2006; 19:1007-1032.
- Bastepe M. The GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Adv Exp Med Biol* 2008; 626:27-40.
- Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, Fauque P, Dupont JM, Gut I, et al. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010; 18(1):73-80.
- Cassidy SB, Schwartz S. Prader-Willi and Angelman syndromes. *Disorders of genomic imprinting*. *Medicine* 1998; 77:140-151.
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet* 2000; 97(2):136-146.
- Chmurzynska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutr Rev* 2010; 68(2):87-98.
- Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71(1):162-164.
- Das R, Hampton DD, Jirtle RL. Imprinting evolution and human health. *Mamm Genome*. 2009; 20(9-10):563-572.
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet*. 2003 Jan;72(1):156-160.
- De Braekeleer and Dao. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6:245-250.
- Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, Wetmur J et al. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* 2009; 4(4):235-240.
- Eggermann T, Eggermann K, Schönherr N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 2008; 24(4):195-204.
- Egozcue J, Templado C, Vidal F, Navarro J, Morer-Fargas F, Marina S. Meiotic studies in a series of 1100 infertile and sterile males. *Hum Genet* 1983; 65:185-188.
- El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, et al. Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* 2001; 27(3):341-344.
- Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA. Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199(5):566.e1-11.
- Fernández-Gonzalez R, Ramirez MA, Bilbao A, De Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev*. 2007 Sep;74(9):1149-1156.
- Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet*. 2003; 72(5):1338-1341.
- Guo L, Choufani S, Ferreira J, Smith A, Chitayat D, Shuman C et al. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* 2008; 320(1):79-91.
- Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril*. 2009 Oct 30. [Epub ahead of print]
- Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Pàldi A, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000; 9(14):2183-2187.
- Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16(21):2542-2551.
- Kobayashi H, Hiura H, John RM, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, et al. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted

conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(12):1582-1591.

Lee HC, Jeong YM, Lee SH, Cha KY, Song SH, Kim NK, et al. Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. *Hum Reprod* 2006; 21(12):3162-3170.

Li T, Vu TH, Ulaner GA, Littman E, Ling JQ, Chen HL, et al. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(9):631-640.

Lim AL, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting effects in a compromised in utero environment: implications for a healthy pregnancy. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(2):201-208.

Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42(4):289-291.

Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003; 40(1):62-64.

Mann MR, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, et al. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* 2004; 131(15):3727-3735.

Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010; 19(1):36-51.

Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; 363(9422):1700-1702.

Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008; 14(2):67-74.

Marques CJ, Francisco T, Sousa S, Carvalho F, Barros A, Sousa M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular

spermatozoa. *Fertil Steril* 2009 Apr 1. [Epub ahead of print]

McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; 37(1):179-183.

McMinn J, Wei M, Schupf N, Cusmai J, Johnson EB, Smith AC et al. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006; 27(6-7):540-549.

Murphy SK, Wylie AA, Coveler KJ, Cotter PD, Papenhausen PR, Sutton VR, et al. Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy. *Hum Mutat* 2003; 22(1):92-97.

Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72(1):218-219.

Park JH, Lee HC, Jeong YM, Chung TG, Kim HJ, Kim NK, et al. MTHFR C677T polymorphism associates with unexplained infertile male factors. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22(9-10):361-368.

Pathak S, Kedia-Mokashi N, Saxena M, D'Souza R, Maitra A, Parte P et al. Effect of tamoxifen treatment on global and insulin-like growth factor 2-H19 locus-specific DNA methylation in rat spermatozoa and its association with embryo loss. *Fertil Steril* 2009; 91(5 Suppl):2253-2263.

Pathak S, D'Souza R, Ankolkar M, Gaonkar R, Balasinar NH. Potential role of estrogen in regulation of the insulin-like growth factor 2-H19 locus in the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 314(1):110-117.

Poplinski A, Tüttelmann F, Kanber D, Horsthemke B, Gromoll J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int J Androl.* 2009 Oct 30. [Epub ahead of print]

Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* 2008; 17(1):1-14.

Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16:2084-2092.

Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22(1):26-35.

Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, McEvoy TG. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 5:68-86.

Surani, M. A., S. C. Barton and M. L. Norris. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; 308:548-550.

Temple IK. Imprinting in human disease with special reference to transient neonatal diabetes and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr Dev* 2007; 12:113-123.

Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000; 15:351-365.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998; 3(3):155-163.

Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27(2):153-154.

Zetterberg H, Zafiroopoulos A, Spandidos DA, Rymo L, Blennow K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2003; 18(9):1948-1950.

Zogel C, Böhringer S, Gross S, Varon R, Buiting K, Horsthemke B. Identification of cis- and trans-acting factors possibly modifying the risk of epimutations on chromosome 15. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(6):752-758.

V CURSO ESHRE DE ANÁLISIS BÁSICO DE SEMEN

Fundació Puigvert

20-23 Septiembre 2010

Barcelona

MÁSTER EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

Del 4 de octubre de 2010 al 30 de septiembre de 2011

*Institut Universitari Dexeus y Unitat de Biologia Cel·lular
de la Universitat Autònoma de Barcelona.*

<http://www.uab.es/postgrau/>

http://www.dexeus.com/es_ES/profesionales-02-0.aspx

ASRM 2010

American Society for Reproductive Medicine

66th Annual Meeting

October 23-27, 2010

Colorado Convention Center

Denver, Colorado

IV SIMPOSIO INTERNACIONAL REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Fundación Tambre

1-3 de diciembre de 2010, Madrid

Palacio de Congresos de Madrid

2ND BIOGENESI CONFERENCE

IN VITRO MATURATION OF HUMAN OOCYTES: BIOLOGICAL FOUNDATIONS FOR A BREAKTHROUGH.

2-4 December 2010

Milan, Italy

ESHRE 2011

27TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION & EMBRYOLOGY

3 to 6 July 2011

Stockholm, Sweden

INDEXACIÓN DE LA REVISTA ASEBIR

Después de varios años publicando artículos de alta calidad científica, demostrando que es una buena alternativa para la publicación de los trabajos tanto de los embriólogos clínicos como de los investigadores en la biología del desarrollo en general, la Revista ASEBIR ha sido indexada en la base de datos Latindex, muy utilizada en iberoamérica, y en la base de datos de ciencia y tecnología (ICYT) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de España. También ha sido aceptada para su inclusión en el Índice Médico Español (IME), la base de datos de Biomedicina del CSIC. En este momento, seguimos gestionando la inclusión de la Revista ASEBIR en otras bases de datos, de tal manera que nuestra repercusión sea cada vez mayor. Este logro, que fue uno de los objetivos prioritarios de la nueva Junta Directiva, y una aspiración de todos los socios de ASEBIR, se ha conseguido gracias al esfuerzo especial de nuestra compañera de la Vocalía de Publicaciones, Marga Esbert, así como a la colaboración directa de nuestro Presidente, Manuel Ardoy.

VI CONGRESO ASEBIR, GIRONA 2011

Los preparativos para nuestro VI Congreso en Girona 2011 van viento en popa. Tanto la organización local como la Vocalía de Congresos están trabajando a marchas forzadas, para que nuestro VI Congreso tenga el mismo éxito, o superior, al alcanzado por el V Congreso de Valencia. En la última página de este número, podéis ver ya el primer anuncio del Congreso ASEBIR de Girona, como un avance de lo que esperamos sea, una vez más, un momento de reunión y reflexión científica (y lúdica) que nos sirva para estrechar aún más los lazos entre los embriólogos clínicos, y, en general, entre los biólogos de la reproducción.

Como siempre, la base de ese éxito será la colaboración y participación de nuestros socios, lo cual damos por descontado.

UN LOGRO MÁS PARA EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

El pasado mes de Marzo, los medios recogieron la noticia del nacimiento de

una niña libre de una distrofia muscular que padece su padre, por primera vez en España, gracias a la utilización del Diagnóstico Genético Preimplantacional por el equipo del Hospital Quirón de Barcelona, con la colaboración de Reprogenetics. Así, se demuestra una vez más la utilidad de esta técnica para que las parejas que tengan un riesgo genético elevado puedan conseguir el sueño de concebir un niño sano.

CERTIFICACIÓN ASEBIR DE EMBRIÓLOGO CLÍNICO

Como se ha anunciado ya en la última Asamblea de ASEBIR en el marco del Congreso de la SEF de Valencia 2010, el pasado Mayo, el proyecto de Certificación de Embriología Clínica de ASEBIR, está en marcha. En un primer momento, habrá una etapa de transición, en la cual se certificará a los embriólogos que ya poseen la Certificación de Embriólogo Clínico Senior de la ESHRE, así como a los embriólogos que acrediten una experiencia determinada. De los avances de este proceso, se os informará oportunamente a través del correo electrónico, la página web, y nuestra revista.

RENOVACIÓN DE LA PÁGINA WEB

Nuestra página web está sufriendo una remodelación profunda, de tal manera que, en breve, podréis contar con una página más atractiva, manejable e interactiva.

Estamos seguros de que esta renovación permitirá a los socios, y al público en general, una navegación más cómoda y amigable que pondrá a nuestro alcance una información relevante y de gran interés para todos nosotros.

¿SE CRUZARON NUESTROS ANCESTROS CON LOS NEANDERTALES?

Aunque nos toque tangencialmente, también resulta interesante para la Biología de la Reproducción. El 7 de Mayo, la revista Science publicó un artículo firmado por prestigiosos investigadores de diversas nacionalidades, entre ellos varios investigadores españoles, donde se demostraría como los humanos

modernos no sólo coincidieron con los neandertales, sino que compartieron con ellos algo más que las cuevas (<http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/328/5979/710.pdf>). Los europeos y los asiáticos, y por supuesto toda su descendencia, tenemos entre un 1-4% de DNA neandertal; no así los africanos, por lo que el "encuentro" debe haber ocurrido al salir los primeros humanos modernos de África, probablemente en el medio oriente. Algunos de los fósiles, cuya recuperación fue fruto de un trabajo exhaustivo de los investigadores españoles, determinante para este hallazgo, fueron obtenidos de la cueva de El Sidrón, en Asturias. Los investigadores españoles diseñaron todo un protocolo para la recuperación de los fósiles, evitando la contaminación del DNA neandertal con el de los propios investigadores.

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 Actualidad y Debate.

Además, la Revista ASEBIR también da cabida a la actualidad en sus secciones de Noticias y Agenda. Por otra parte, la Revista ASEBIR cuenta con un apartado de Formación Continuada, y un Aula Joven, en la que los embriólogos jóvenes pueden publicar sus primeros trabajos.

La Revista ASEBIR se publica semestralmente, por lo que es indispensable que los escritos sean enviados antes del 31 de Marzo, para el primer número del año (Junio) y antes del 30 de Septiembre, para el segundo número del año (Diciembre). Los artículos originales serán sometidos a la evaluación de dos revisores externos y deberán ser acompañados de una carta en la que se declare que el artículo no ha sido publicado con anterioridad en otro medio, y donde se ceda los derechos de publicación a ASEBIR. El formulario para esta carta se puede descargar desde la página web de ASEBIR. Para la reproducción de material ya editado es necesaria la autorización expresa de los propietarios del copyright.

Los originales deberán ser enviados a la dirección de correo electrónico de la Secretaría de ASEBIR (asebir@asebir.com).

Los manuscritos deberán ser remitidos en formato DOC (Times New Roman 12p, a doble espacio), acompañado del documento correspondiente en PDF. Para los artículos en general se sugiere una extensión no superior a las trece hojas a 30 líneas, con no más de seis figuras y seis tablas.

Los Artículos Originales, Aula Joven y Formación Continuada deben estar acompañados de un Resumen y Palabras

Claves, en Español e Inglés (Summary and Key Words), así como de la traducción del Título al Inglés. El orden sugerido para estos artículos es: Título en Español; Título en Inglés; Nombre y Apellidos de cada uno de los autores; Nombre completo del Centro, con la dirección para la correspondencia, incluido el correo electrónico del autor responsable; Resumen y Palabras Clave, en Español e Inglés; Introducción; Material y Métodos; Resultados; Discusión; Agradecimientos; Referencias Bibliográficas; Tablas y Figuras. Las tablas se numerarán con números romanos y las figuras con números arábigos. Los pies de figura deberán ser listados en una hoja aparte, al final del artículo, y cada figura llevará escrita su numeración.

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

Las referencias se presentarán en la sección Referencias Bibliográficas 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 da un ejemplo de formato de citas bibliográficas:

A) Artículo de revista con menos de seis 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 seis autores

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

C) Libro completo

Colson JH, Armour WJ. *Spermatogenesis*. 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. Hatching assisted. XXII Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology; 1997 Junio 20-23; Roma, Italia. p. 1561-1562.

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

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

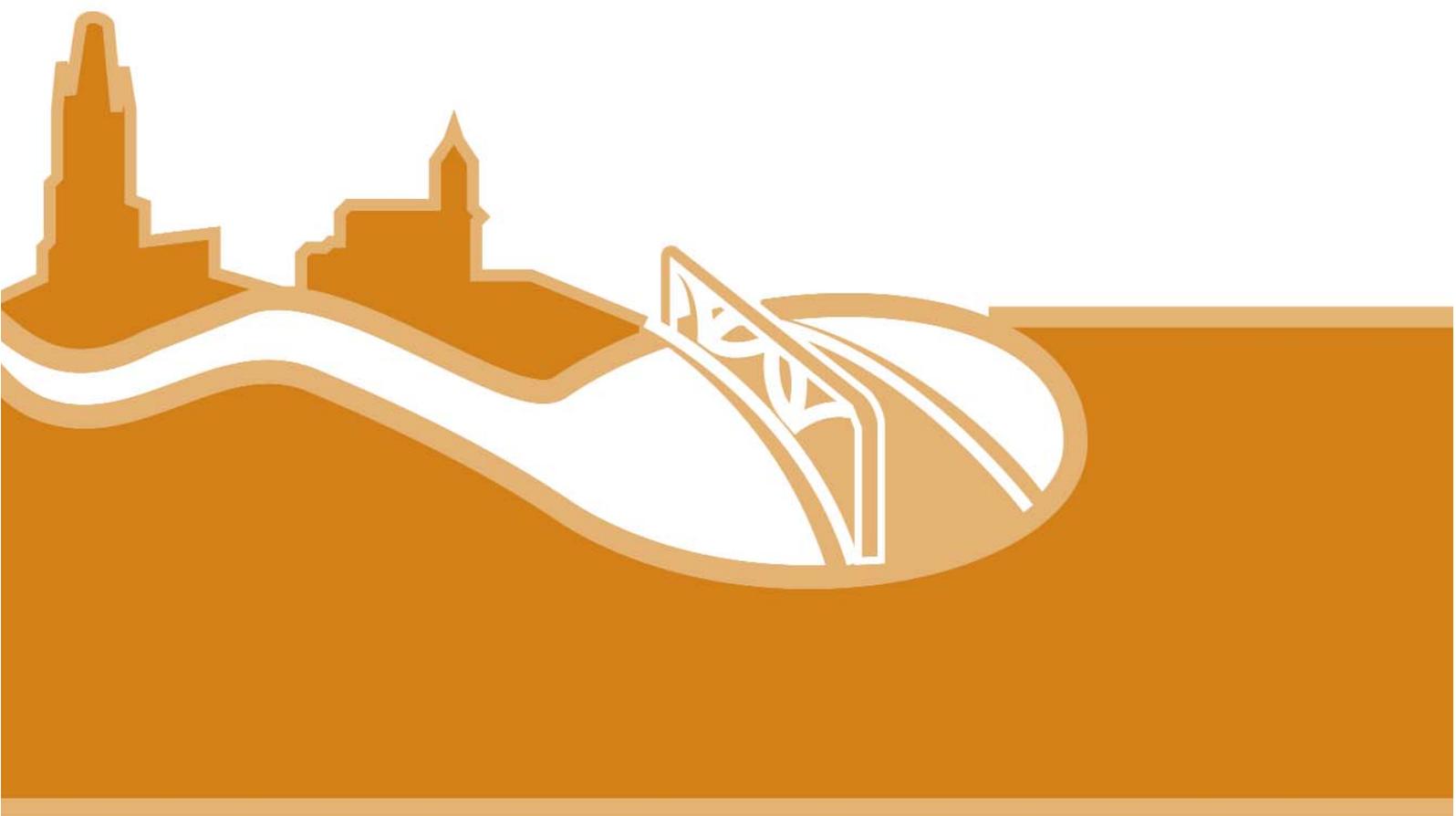


ASEBIR

VI CONGRESO GIRONA 2011

Auditori Palau de Congressos de Girona

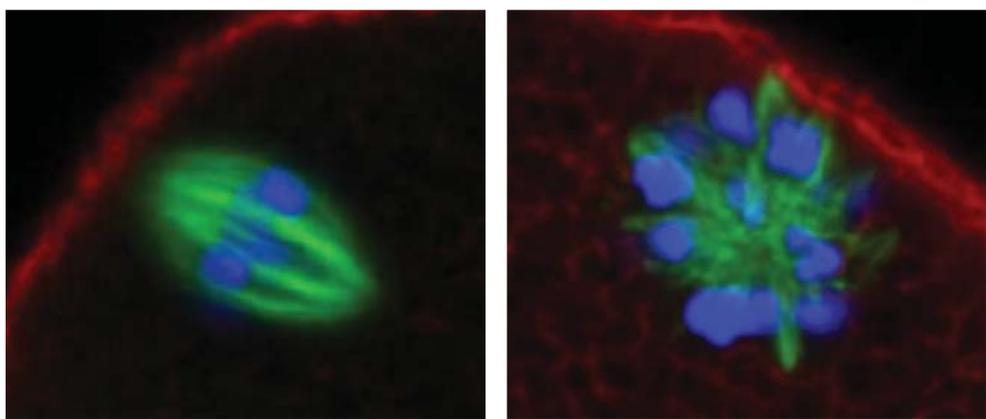
5, 6 Y 7 DE OCTUBRE



SECRETARÍA TÉCNICA:

Grupo Process · Betaprocess, S.L.

C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª - Madrid 28037 · Telf.: +34 91 377 14 23 / Fax: +34 91 377 49 65 · E-mail: VIcongreso@asebir.com



ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ASEBIR

asebir@asebir.com | www.asebir.com