

ASEBIR

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

DICIEMBRE 2018 **VOL. 23 N° 2**

5 EDITORIAL

6 SOCIOS POR EL MUNDO

12 AULA JOVEN

- DESCELULARIZACIÓN EN ÓRGANOS REPRODUCTIVOS FEMENINOS (12)
- LA DOBLE CARA DE LA ZONA PELÚCIDA (21)
- INFLUENCIA DE LOS GENES DE EFECTO MATERNO Y TRANSICIÓN MATERNO-CIGÓTICA (31)
- TRANSFERENCIA NUCLEAR, ÚLTIMA TECNOLOGÍA PARA PREVENIR LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES (39)

46 FORMACIÓN CONTINUADA

- GIE: MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y CORRELACIÓN CON ANEUPLOIDÍAS (46)
- GIC: CONTROL DE CALIDAD EXTERNO EN EL LABORATORIO DE RHA (51)

60 NOTICIAS

- PRIMEROS RESULTADOS ENCUESTA ASEBIR (60)
- POR LA TRANSPARENCIA (62)
- GANADORES I CONCURSO FOTOGRAFÍA ASEBIR (65)
- BOLSA DE VIAJE 2018-2019 (67)
- NOTICIAS BREVES (68)

70 ACTUALIDAD

- CURSO GIE (2ª EDICIÓN). ENTREVISTA PONENTES (70)
- SITUACIÓN ACTUAL EMBRIÓLOGO CLÍNICO (79)

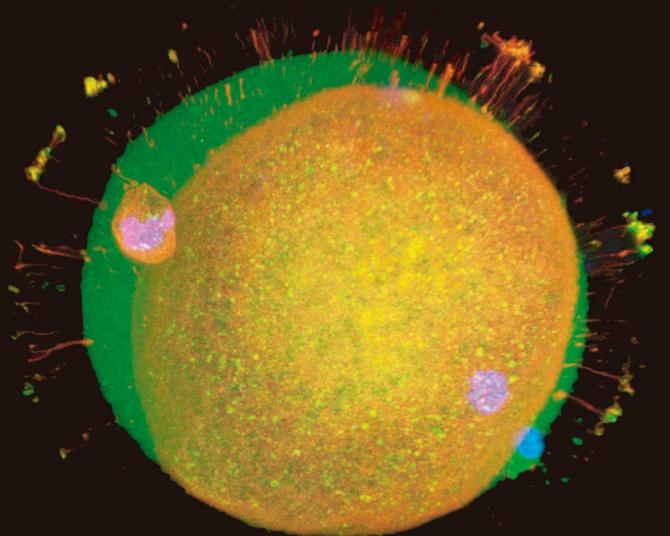


Imagen portada:

1º premio Concurso Fotografía 25 Aniversario ASEBIR

Título: Lo esencial es invisible a los ojos - Antoine de Saint-Exupéry

Descripción: Tinción con faloidina (rojo), DAPI (azul) y anti-AQP3 (verde). Ovocito MII bovino.

Autores: Tania García Martínez (nº socio 1218) y Meritxell Vendrell Flotats e Iris Martínez Roderó (nº socio 1200).

Ganador Premio: Tania García Martínez (nº socio 1218)

EDITORIAL	5	NOTICIAS BREVES	68
Por nosotros. Contra nadie Antonio Urries López			
SOCIOS POR EL MUNDO	6	ACTUALIDAD	70
AULA JOVEN	12	Curso GIE: Aspectos prácticos sobre el cultivo, clasificación, biopsia, vitrificación y desvitrificación de blastocistos humanos (2ª edición). Entrevista a los ponentes	
Descelularización en órganos reproductivos femeninos: visión general del conocimiento actual y avances recientes en medicina reproductiva Neus Moranta		Situación actual embriólogo clínico	
La doble cara de la Zona Pelúcida Ana Guerrero Mayo			
Influencia de los genes de efecto materno y transición materno-cigótica Tania Moreno			
Transferencia nuclear, última tecnología para prevenir las enfermedades mitocondriales Aina Solé Garrigós			
FORMACIÓN CONTINUADA	46		
Grupo de interés en embriología: Morfología embrionaria y correlación con aneuploidías Arantxa Delgado			
Control de calidad externo en el laboratorio de reproducción humana asistida Luis Martínez-Granados			
NOTICIAS	60		
Primer resumen de los resultados de la encuesta por la Junta Directiva			
Por la transparencia			
Ganadores I Concurso de Fotografía ASEBIR			
III Convocatoria de bolsas de viaje para estancias en el extranjero. Convocatoria 2018/2019			

Diciembre 2018 Vol. 23 N°2

EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Laura Mifsud i Elena. Hospital Quirónsalud, Valencia

Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra

Yosu Franco Iriarte. Donostia – San Sebastián

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Antonio Urries López. Hospital Quirónsalud, Zaragoza

Vicepresidente:

Mark Grossmann i Camps. Barcelona IVF, Barcelona

Secretaría:

Beatriz González López de Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra

Tesorero:

Nicolás Prados Dodd. IVI Sevilla, S.L., Sevilla

Grupos de Interés:

Belén Buch Tome. Centro Gutenberg, Málaga

Nicolás Prados Dodd. IVI Sevilla, S.L., Sevilla

Docencia y Formación:

Antonio Alcaide Raya. REPROFIV, Madrid

Cristina Camprubí Sánchez. Genintegral, Reference Laboratory Genetics, UAB, Barcelona

Francisco Javier Vendrell Montón. Sistemas Genómicos, S. L., Paterna, Valencia

Congresos, Publicaciones e I+D:

Laura Mifsud i Elena. Hospital Quirónsalud, Valencia

Beatriz González López De Bustamante. Clínica Nida, Vigo, Pontevedra

Yosu Franco Iriarte. Donostia – San Sebastián

Tecnología de la información y comunicación:

Abel Gayo Lana. FIV4-Instituto De Reproducción Asturiano, Oviedo

Enrique Olaya Vila. IVF Spain Alicante, Alicante

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

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR

C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º, 6ª

28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94

www.asebir.com · asebir@asebir.com

DISEÑO Y MAQUETACIÓN

Góbalo, Agencia Creativa Digital

C/ De Eraso 36 · 28028, Madrid

Tfno.: 91 626 39 74 · www.gobalo.es · hola@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424

SopORTE válido: 78-R-CM

POR NOSOTROS. CONTRA NADIE.

Recientemente un buen amigo ginecólogo me invitó a dar una charla en una reunión científica que estaba organizando en su ciudad. Una de esas jornadas tan habituales en nuestra profesión.

Muy amablemente me ofreció que eligiera yo mismo el tema del que hablar, siempre que fuera algo sobre lo que se pudiera generar debate. Dado que es una reunión a la que suelen asistir tanto embriólogos como ginecólogos pensé que podía ser un buen foro donde debatir nuestro papel en el mundo de la Reproducción Asistida. Ya sabéis. Responsabilidades y obligaciones, pero también derechos.

Tengo que decir que le pareció una idea estupenda y así quedó definido en el programa.

La sorpresa vino cuando, unos meses antes de la celebración de dichas jornadas, el organizador del evento se volvió a poner en contacto conmigo para rogarme que cambiara el tema de mi exposición, ya que, determinadas personas le habían manifestado cierta preocupación frente a la posibilidad de que se generase un debate “incómodo” sobre ello.

Pero... ¿no se trataba precisamente de eso? (lo de “incómodo” vamos a dejarlo aparte).

Naturalmente, por respeto a mi amigo, le manifesté que no había problema. Retiraba la charla. Pero, obviamente, también me retiraba yo de ponente e incluso, a partir de ese momento, de la asistencia a ese foro.

Con esta reflexión no quiero entrar en polémica sobre la preocupación que pueda generar en algunas personas que se hable de cuál es nuestro papel real en el mundo de la Reproducción Asistida, aunque resulta preocupante que haya gente que vea con miedo nuestro deseo de regulación profesional, y no entienda que defender nuestro espacio no significa invadir el de nadie.

Quizá deberíamos todos meditar (unos y otros) sobre cuál es ese espacio que nos corresponde a cada uno. E incluso debatirlo. Aunque a alguno no le guste.

Afortunadamente estamos hablando de situaciones excepcionales, pero que dejan claro que aún nos queda mucho por hacer.

Lo que también deja claro es que somos nosotros los que tenemos que hacerlo.

Y en ello estamos.

Seguimos avanzando con nuestras propuestas y, por lo menos, ya hemos conseguido entre todos retrasar la puesta en marcha del Registro Estatal de Profesionales Sanitarios (Portal REPS) con el compromiso de incluir el concepto de “Facultativo en Biología de la Reproducción”. Pero esto es sólo el primer paso.

Y como dice el título de esta editorial.

Solamente por nosotros.

Nunca contra nadie.

Antonio Urries López

SOCIOS POR EL MUNDO: IÑAKI ARROYOS

Desde ASEBIR queremos conocer, y dar a conocer a nuestros socios. Queremos hacerte más partícipe de la asociación que nos une y queremos saber qué intereses os mueven y promoverlos si eso es posible.

En la edición anterior contamos con un grupo de jóvenes emprendedores, mientras que en esta ocasión, hemos querido conocer la historia e inquietudes de Iñaki Arroyos Solaguren, nuestro socio 893 que cuenta con 10 años de experiencia como embriólogo en nuestro país, 12 en total de su experiencia profesional, y que recientemente ha iniciado una aventura que ahora nos va a contar.

ASEBIR: ¡Bienvenido, Iñaki! Es un placer para nosotros contar contigo para conocer un poco mejor a nuestros socios. Pero antes de empezar, y para todos los socios que nos leen que no te conozcan, cuéntanos un poco sobre ti y tu evolución.

Iñaki Arroyos: ¡Hola equipo! Antes de nada agradecer la iniciativa de ASEBIR de dar a conocer nuestro trabajo y por el esfuerzo realizado día a día por defender nuestros intereses.

Pues como bien has dicho, mi nombre completo es Iñaki Arroyos Solaguren y soy socio de Asebir desde **2012**. Nací en Toledo hace 36 años y viví en mi ciudad natal hasta que terminé mis estudios de Bachillerato, momento en que me trasladé a Madrid para estudiar la carrera de Biología.

Mi primer contacto con la reproducción asistida se produjo en el último año de mis estudios universitarios, cuando me ofrecieron la posibilidad de acudir durante dos meses a la Unidad de Reproducción del Hospital Virgen de la Salud en Toledo.

ASEBIR: Sabemos que la primera toma de contacto con nuestra profesión puede marcar un antes y un después. ¿Qué tal fue esa experiencia?

Iñaki: Pues en esa ocasión, de la mano de Silvia Jiménez Bravo, por aquel entonces directora del laboratorio, pude ser testigo de cómo funcionaba una unidad de reproducción, así como de los distintos procedimientos que se llevan a cabo más concretamente



Iñaki Arroyos

dentro de un laboratorio.

Sinceramente, me atrajo desde el principio y vi una muy interesante y excitante salida en el mercado laboral por aquel momento.

ASEBIR: *Cómo puede ser el destino, un ofrecimiento que llevó a una vida profesional enriquecida. ¿Cómo llegaste finalmente a convertirte en el Iñaki que conocemos ahora?*

Iñaki: Fue al terminar mi proyecto final de carrera, que tuve la suerte de incorporarme a nuestra disciplina en FIV Center en Madrid, puesto que necesitaban personal para formar como embriólogo. Allí, Antonio Alcaide, como director del laboratorio, y Eva Huguet

como embrióloga senior, fueron los encargados de mi formación.

Después de varios años desarrollando mi labor como embriólogo junior, y tras un máster en reproducción asistida, cursos de genética y la certificación europea de Senior Embryologist, surgió la oportunidad de ejercer de supervisor del laboratorio y más adelante ser responsable de laboratorio durante 3 años. Y ya son 10 años de experiencia.

ASEBIR: *Diez años, que se dice pronto... Sabemos que actualmente estás inmerso en un proyecto en China. ¿Cómo surgió esta iniciativa?*

Iñaki: En mi adolescencia había realizado varias estancias cortas de

1-2 meses en el extranjero y quizás por ello siempre me ha llamado mucho la atención tener la oportunidad de vivir fuera de España por un tiempo más largo.

Soy una persona muy abierta, con ganas de conocer otras culturas y vivir diferentes experiencias. Ya en FIV Center me surgió la oportunidad de poder trabajar en Connecticut (USA) con el grupo del Dr. Lavy pero debido a la complicación de la obtención del visado, principalmente, no se pudo formalizar el proceso.

Unos años más adelante, Ellen She (*IVF consultant* en Stamford), a quien había tenido la oportunidad de conocer cuando acudí a Connecticut en busca del “sueño americano”, me ofreció la oportunidad de unirme a un proyecto en la ciudad costera de Quanzhou al sureste de China. Una ciudad no muy conocida pero con potencial de crecimiento y cercana a una de las ciudades más atractivas para vivir en China, Xiamen. Se trataba de un proyecto que empezaba a dar sus primeros pasos como departamento de reproducción en uno de los hospitales más nuevos de la ciudad. Necesitan a un embriólogo senior para formar personal y supervisar el trabajo diario de laboratorio. Después de varios años en FIV Center y más de 15 años viviendo en la capital de España, decidí salir de mi zona de confort y cumplir uno de mis sueños.

ASEBIR: Y ahora que ya llevas un tiempo allí, cuéntanos algunas cosas de cómo funcionan allí las cosas, por ejemplo, ¿qué regulación existe en China para la reproducción asistida?

Iñaki: La Reproducción asistida en China está regulada por el Ministerio de Salud. La regulación es a nivel nacional con ligeras diferencias entre las diferentes provincias.

Entre las técnicas permitidas, se incluyen la inseminación, FIV-ICSI, semen de donante, TESA, IVM, congelación de semen, vitrificación de ovocitos y embriones y PGD/PGS. No están permitida la donación de ovocitos con fines comerciales, la donación de embriones ni el vientre de alquiler.

Es importante mencionar que allí, la aplicación o no de algunas técnicas tiene ciertos matices. El uso de semen de donante está permitido pero el centro debe tener una licencia especial.

En relación a la donación de ovocitos, la ley prohíbe el uso comercial de ovocitos con fines lucrativos. Solo en casos puntuales se pueden realizar, como el caso de pacientes que tiene un número elevado de ovocitos después de la punción y deciden donar algunos de ellos. En ese momento tiene que haber una paciente receptora que los recibe, lo que en términos prácticos es muy difícil de conseguir. Sin embargo en China proliferan las agencias y/o clínicas que ofrecen servicios de donación al margen de la ley.

La ICSI está permitida pero se tiene que justificar y los criterios varían ampliamente entre centros siendo, obviamente, la causa más común el factor masculino. Este hecho hace que la FIV clásica sea la técnica más usada para la fertilización.

En cuanto al límite del número de embriones a transferir, 2 embriones es el máximo.

ASEBIR: Curioso las diferencias con nuestro país. Y en lo relativo a la accesibilidad a los tratamientos, ¿qué límites se establecen allí?

Iñaki: En relación a este tema, China sólo permite acceder a tratamientos de reproducción a parejas casadas y no está permitido para mujeres solas o parejas del mismo sexo. Esto se debe al carácter muy tradicional de la sociedad. En cierta manera, las mujeres solas mayores de 30 años están estigmatizadas por la sociedad y las únicas opciones de estas mujeres de ser madres pasan por viajar fuera del país a buscar tratamientos, normalmente, con un alto coste.

ASEBIR: Y en cuanto a los centros, ¿qué requisitos deben cumplirse para entrar en funcionamiento?

Iñaki: En China, para que un centro esté legalmente operativo y pueda ofrecer servicios de FIV, el departamento de reproducción tiene que realizar

inseminaciones durante 2 años. Después debe pasar una revisión gubernamental que determine que esté apto para dar el salto a la FIV. A su vez, para ofrecer servicios de diagnóstico genético, el centro de estar 5 años haciendo FIV-ICSI para solicitar la licencia de actividad en genética.

En cuanto al modelo de gestión, los centros privados en China son una minoría y alrededor del 90% corresponden a centros públicos.

ASEBIR: Y, ¿deben seguir algunas normas específicas?

Iñaki: Es el gobierno, a través de un organismo profesional llamado CSRM (Chinese Society of Reproductive Medicine) quien se encarga de redactar unas *Guidelines*, que deberán seguir los centros. La última versión corresponde al 2015 y es elaborada por un conjunto de expertos.

ASEBIR: ¿Podrías hablar acerca de los resultados que obtienen?

Iñaki: En general los resultados nacionales son bastante buenos. Es cierto que la edad media de las pacientes es más joven que en Europa y, particularmente, que en España, pero teniendo en cuenta que no hay tratamientos de donación de ovocitos los resultados son muy competitivos.

En nuestro centro y correspondiente al año anterior, hay una tasa de embarazo clínico del 62%, una tasa de implantación del 42% y una tasa de nacido vivo del 51% en transferencias en fresco. En lo referente a criotransferencias los datos se sitúan un poco por encima con un 71% de tasa de embarazo clínico, un 45% de tasa de implantación y un 52% de tasa de nacido vivo.

En el centro donde trabajo, se apuesta desde el principio por invertir en la calidad del aire, instalando un sistema que monitoriza constantemente parámetros importantes como presión, velocidad del aire, nº renovaciones, nivel de VOC, temperatura y humedad. A su vez, la individualización de cada tratamiento y la experiencia aportada por el sistema de trabajo español y

americano hacen posible obtener buenos resultados.

ASEBIR: *¿Qué te ha llamado la atención o qué particularidades tiene la reproducción asistida en China que no haya en Europa?*

Iñaki: Pues, por ejemplo, es curiosa la poca oferta que hay para la elección de medios de cultivo. Esto se debe a que es muy difícil conseguir, por parte de las compañías, la licencia correspondiente. En relación a esto, los servicios asociados con dichas compañías, así como la distribución a las clínicas, a veces, carecen de la calidad o profesionalidad suficiente debido a la falta de competencia.

Otro aspecto que llama la atención y, como se puede esperar, es que hay algunos centros que realizan muchísimos ciclos. Concretamente un hospital de Hunan lleva a cabo unos ¡¡40000 ciclos al año!! Para ello el hospital sólo ofrece servicios de FIV.

ASEBIR: *¿40000 ciclos? Debe ser un centro enorme... ¡Qué interesante! ¡Sigue, sigue!*

Iñaki: Sí, la verdad es que impacta...

Otra de las diferencias que se pueden ver con España, por ejemplo, es la apuesta en muchos centros por la maduración *in vitro* de ovocitos. Nosotros, en nuestro centro, hemos empezado ahora a tratar de definir los protocolos y, más exactamente, a definir las dosis y los tiempos de HMG y HCG para la maduración de los ovocitos.

A nivel técnico, como he comentado anteriormente, otra diferencia significativa es que se hace mucha FIV ya que aquí se tiene que justificar el uso de la ICSI. Cada grupo tiene criterios diferentes. En relación a este hecho, hay clínicas que, por ejemplo, con muestras de semen no indicadas para ICSI pero que no tienen valores de REM altos en pacientes con infertilidades primarias, realizan una FIV corta de 4 horas y chequean la extrusión del segundo cuerpo polar. En los casos que no hay extrusión del segundo cuerpo polar a las 6h, proceden a hacer un rescate con ICSI con resultados más que aceptables.

Aquí, una de las claves, es fertilizar los ovocitos dentro de la ventana de competencia de desarrollo.

Otra diferencia es la tendencia a transferir en día 3 y no en día 5 de desarrollo como viene siendo alza en Europa. Principalmente se debe a que muchos clínicos tienen miedo a que no haya ningún blastocisto óptimo para transferir y tengan que dar una información complicada a la paciente. Esta estrategia se debe también a la inexperiencia de muchos centros en desarrollar un óptimo cultivo a blastocisto. En otras ocasiones, los centros nuevos se declinan por el día 3 porque esta práctica le genera más embarazos y así construyen un buen nombre para atraer más pacientes en el futuro aunque se paga el coste de altas tasas de embarazos múltiples. En cambio, otros grupos defienden la idea de que el embrión en día 3 está expuesto a menos riesgo de cambios de tipo epigenético en el útero materno en comparación con el cultivo *in vitro*.

Relativo a aspectos sociales, la inmensa población hace que las consultas en los hospitales estén abarrotadas y la atención al paciente quede reducida en muchísimos casos a unos escasos 2 minutos por paciente. Esto en Europa sería inadmisibles pero aquí es bastante normal. El paciente no recibe el tiempo que mereciera.

Otro aspecto completamente diferente que también atiende a normas sociales es el de la privacidad. Aquí básicamente no la hay. Es fácil darse un paseo por las consultas de reproducción para ver como decenas de pacientes colapsan la consulta y están presentes a escasos metros de una revisión de otra paciente.

Otra diferencia que atiende a normas de la sociedad es el horario. Aquí en China a las 12 am es la hora de la comida y es muy usual que todo el mundo duerma hasta el comienzo del turno de tarde a las 14:00.

La capacidad de trabajo es otra cosa que me llama bastante la atención. Aquí se trabaja mucho y me refiero con mucho, no a muchas horas al día, si no muchos días al mes. En concreto como

norma se trabaja la jornada completa de lunes a viernes y todos los sábados media jornada. Ya sabemos que en esta profesión también tenemos que cubrir domingos y festivos por lo que persona que trabaje en el laboratorio y que cubra dos fines de semana al mes tiene 2 días libres por mes. Aquí se vive para trabajar.

ASEBIR: *Y ahora mismo, Iñaki, ¿qué planes de futuro tienes?*

Iñaki: Pues justamente en Enero de 2019 finaliza mi contrato, por lo que ahora mismo estoy en búsqueda de nuevos retos profesionales. Antes de volver a España me gustaría pasar una temporada en Australia: Idioma inglés, buen balance entre vida laboral y personal y destino puntero en reproducción son alicientes suficientes para intentar dar el próximo paso en esa dirección. La dificultad principal para trabajar en Australia radica en la necesidad de un visado de trabajo, por lo que si en un tiempo razonable no es posible desarrollar mi actividad profesional allí me enfocaré en nuevos retos en Europa. Por supuesto, si hay algún proyecto interesante en España se volverá a casa con muchas lecciones aprendidas, no solo de embriología si no de vida.

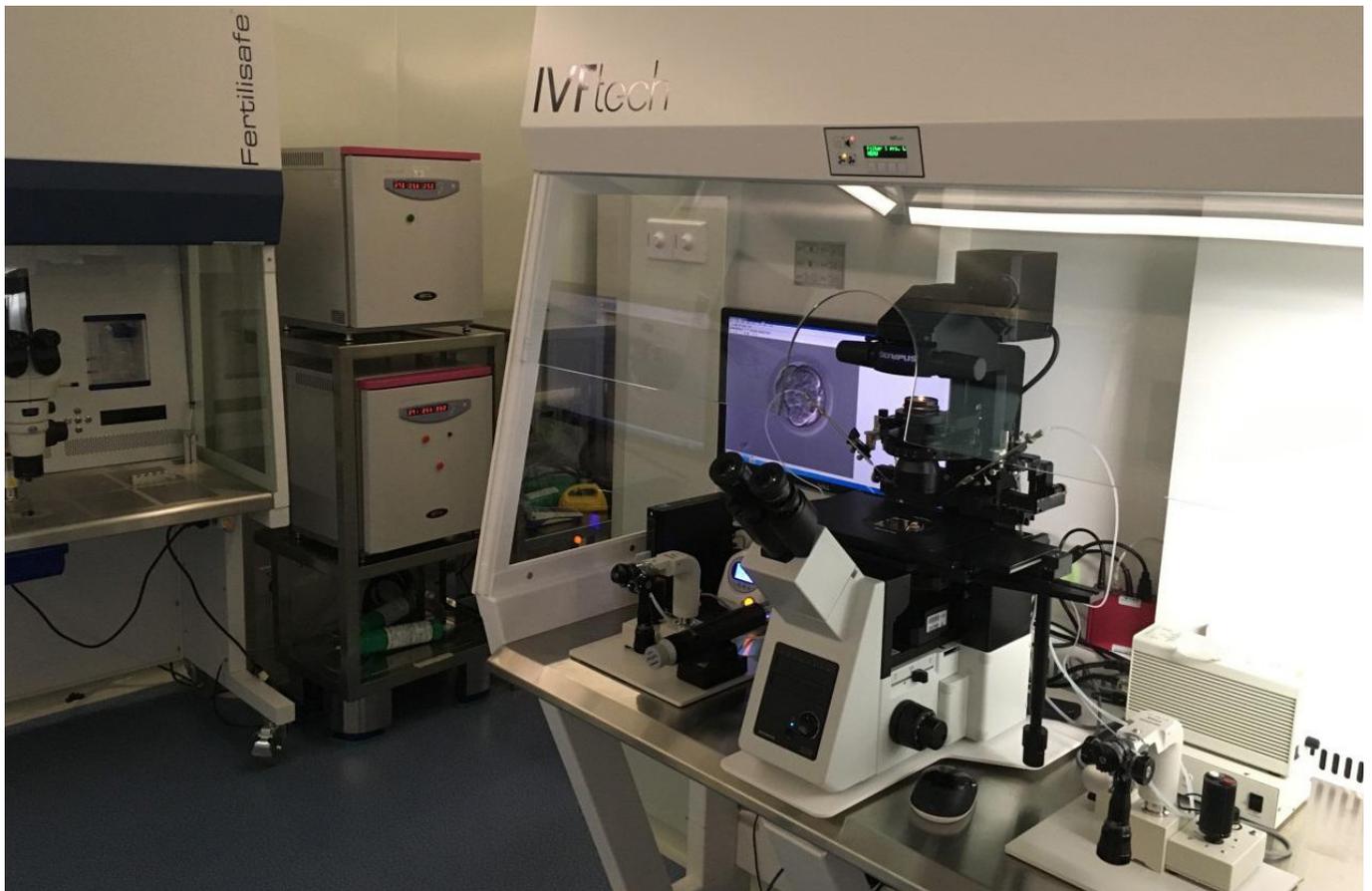
ASEBIR: *Y nosotros que podamos compartir todos tus éxitos contigo. Siempre es un placer contar con profesionales como Iñaki y te damos las gracias por el tiempo que nos has dedicado.*

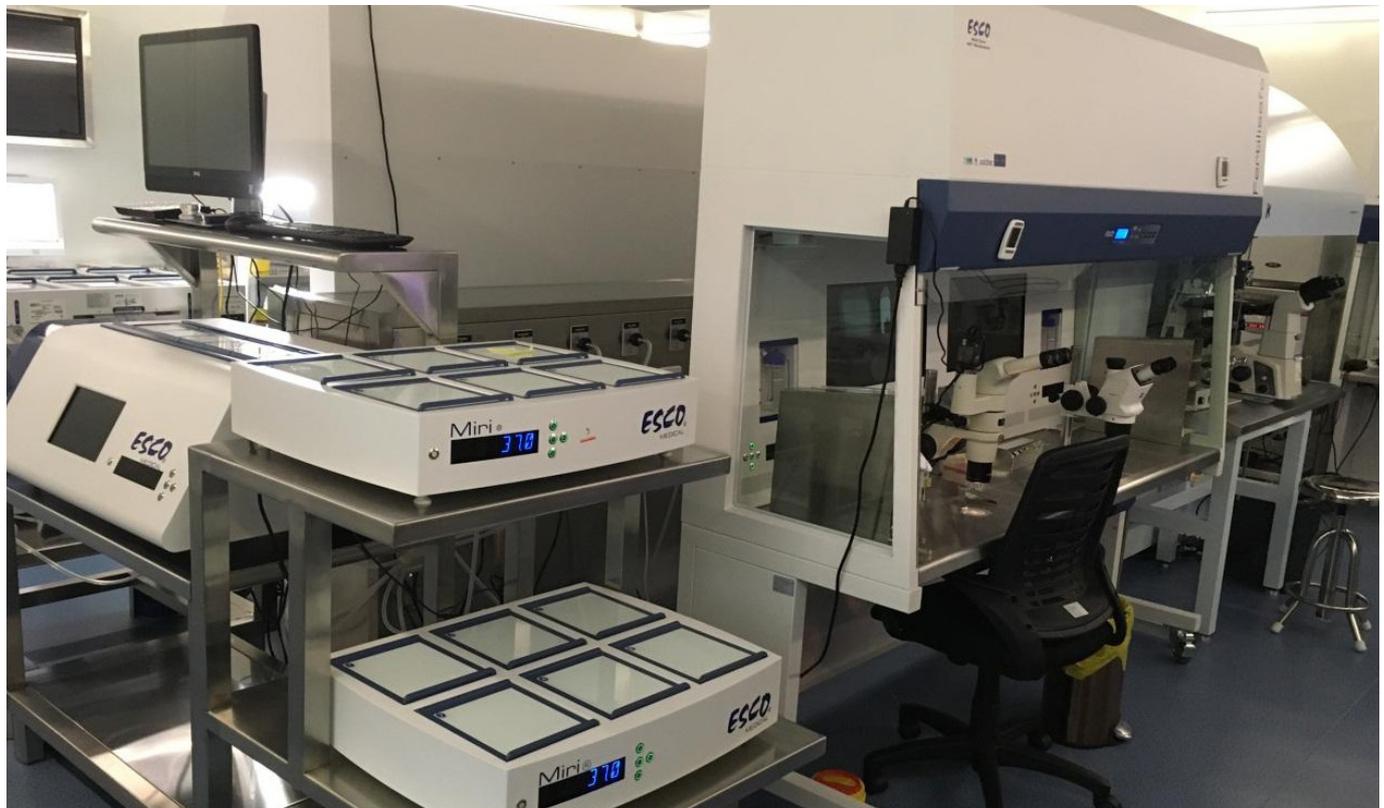
Iñaki: Gracias a vosotros por pensar en mí para este espacio, y sobretodo espero que haya ayudado a conocer un poco mejor nuestra profesión en otro lado del mundo. ¡Gracias!

ASEBIR: *Y quién sabe si dentro de poco tiempo, nos volvemos a poner en contacto contigo para que nos cuentes la situación en Australia...*

(Todos ríen).

ASEBIR: *Os dejamos algunas imágenes que Iñaki nos ha traído de su centro y equipo donde trabaja.*





**ASEBIR: Y a todos los que nos leen....
¿Tenéis alguna experiencia que contarnos?, ¿te gustaría que te entrevistásemos para contarnos tu estancia en otro lugar del mundo?**

Ponte en contacto con nosotros a través de la Secretaria de ASEBIR (asebir@asebir.com) y nos pondremos en contacto contigo para conocer tu experiencia.

**¡Anímate a participar!
¡Queremos conocerte!**

Nueva sede, nueva web

Pioneros

QUERMED

Tecnología Médica

FAMILIA GLOBAL

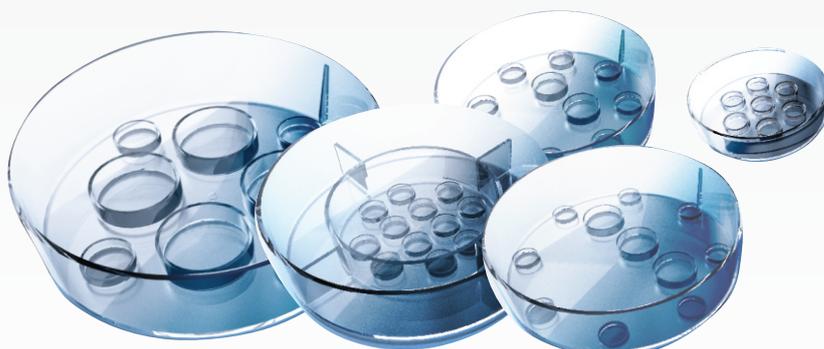
MEDIO ÚNICO, SOLUCIÓN ÚNICA

- Cultivo ininterrumpido hasta Blastocisto.
- Probada Consistencia entre Lotes
- Más de 500 Estudios Clínicos Independientes Publicados en los últimos 15 años
- Rendimiento Probado



PLACAS GPS

MENOS RIESGO, MENOS PREOCUPACIONES, MENOS TIEMPO



Rápida localización del embrión
 Mantienen la temperatura estable
 Las gotas no se mezclan
 Embriotestadas, Certificado CE

DESCELULARIZACIÓN EN ÓRGANOS REPRODUCTIVOS FEMENINOS: VISIÓN GENERAL DEL CONOCIMIENTO ACTUAL Y AVANCES RECIENTES EN MEDICINA REPRODUCTIVA

DECLLULARIZATION OF FEMALE REPRODUCTIVE ORGANS: A GENERAL OVERVIEW OF CURRENT KNOWLEDGE AND RECENT ADVANCES IN REPRODUCTIVE MEDICINE.

Neus Moranta. P. Estudiante del Máster Universitario en Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida de la Universidad de Valencia junto con IVI-RMA E-mail: nmorantaperello@gmail.com

RESUMEN: En un 38% de los casos se atribuye la infertilidad a causas femeninas, la mayoría de las cuales pueden subsanarse con técnicas de reproducción asistida, pero aun así existen un conjunto de patologías ginecológicas cuya funcionalidad sólo puede restituirse con tratamientos quirúrgicos basados en la escisión y criopreservación de corteza ovárica, los trasplantes de útero o la histeroscopia reparativa. Las limitaciones asociadas a estos son la posible reintroducción de células cancerígenas, la necesidad de inmunosupresión o el estado y disponibilidad de los órganos. Los avances en los conocimientos de la Medicina Regenerativa están siendo de gran valor en la medicina reproductiva, ofreciendo la terapia celular y la ingeniería de tejidos como alternativas a las técnicas habituales. Esta revisión ofrece una visión general de las investigaciones y avances actuales en la bioingeniería de tejidos a partir del uso de órganos descclularizados y su aplicación clínica en medicina reproductiva.

Palabras clave: Genitales femeninos, ingeniería tisular, órganos artificiales, Medicina Regenerativa, útero, ovario, vagina.

ABSTRACT: In 38% of cases sterility is attributed to female causes, most of which can be overcome with assisted reproduction techniques, but there are a number of pathologies whose functionality can only be restored with surgical treatments based on excision and cryopreservation of the ovarian cortex, uterine transplants or reparative hysteroscopy. The limitations associated with these techniques are the possible reintroduction of cancer cells, the need for immunosuppression or the state and availability of organs. Advances in the knowledge of Regenerative Medicine are being of great value in reproductive medicine, offering cell therapy and tissue engineering as alternatives to the usual techniques. This review offers an overview of current research and advances in tissue bioengineering from the use of decellularized organs and their clinical application in reproductive medicine.

Keywords: Female genitalia, tissue engineering, artificial organs, Regenerative Medicine, uterus, ovaries, vagina.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que entre el 2-14% de las parejas en edad reproductiva son estériles. En un 38% de los casos se atribuye tal afección a causas femeninas, la mayoría de las cuales pueden subsanarse mediante el uso de técnicas de reproducción asistida (TRA), pero hay un conjunto de pacientes cuya patología no es tratable. Algunos de estos casos incluyen las adherencias intrauterinas, las malformaciones congénitas, la ausencia de útero funcional (tanto de origen congénito como el Síndrome Mayer-Rokitansky-

Käuser-Hauser e hipoplasia uterina, como adquirido debido a histeroscopias por tumoración maligna, hemorragia postparto...), etc... (Campo, Baptista et al. 2017; Campo, Cervelló et al. 2017; Peng et al. 2017). Por otra parte, los efectos gonadotóxicos de las terapias anticancerígenas, resultan frecuentemente en la infertilidad crónica. Además, las mujeres jóvenes pueden padecer un fallo ovárico prematuro por predisposición genética (ej.: Síndrome de la X-frágil y Síndrome de Turner), a un cáncer familiar de inicio temprano (BRCA1/2), o como consecuencia a tratamientos para otras enfermedades (Laronda et al. 2015).

Actualmente, la función reproductiva de estas pacientes sólo puede restituirse con tratamientos quirúrgicos basados en trasplantes de útero, histeroscopia reparativa o la escisión y criopreservación de corteza ovárica. Las limitaciones asociadas a estos enfoques son varias, como la falta de donantes de útero, la necesidad de una larga inmunosupresión y la posibilidad de reintroducir células cancerígenas con el autotransplante de corteza ovárica (Kakabadze et al. 2017; Kuo et al. 2017; Peng et al. 2017; Campo, Cervelló et al. 2017). Otras opciones actuales a las que recurrir serían la gestación subrogada o la adopción (Tamadon et al. 2016).

Las investigaciones hoy en día en la bioingeniería de tejidos femeninos reproductivos y el mayor conocimiento de su fisiología dan pie a nuevas esperanzas para las mujeres que sufren este tipo de patologías gracias a modelos complejos desarrollados por la Medicina Regenerativa (MR) (Campo, Baptista et al. 2017). Esta ciencia se divide en dos ramas principales: por un lado la terapia celular, basada en la utilización de células para reconstruir o restaurar tejidos dañados, y por otro lado la Ingeniería de Tejidos (IT), basada en la utilización de moldes para la formación de estructuras tridimensionales (3D) destinadas a funcionar como órganos. Los moldes pueden construirse de manera artificial, a partir de biomateriales sintéticos y/o derivados de otros componentes naturales como polímeros y proteínas (Campo, Cervelló et al. 2017; Peng et al. 2017). Además, el uso de órganos descelularizados proporciona el molde ideal para la reconstrucción de los órganos en 3D.

Para restituir y mantener la función normal de los órganos se requiere del establecimiento de sustitutos biológicos que puedan cubrir las condiciones

apropiadas de adhesión, crecimiento, migración, proliferación, señalización y diferenciación celular (Olalekan et al. 2017; Tamadon et al. 2016). Así pues, las propiedades ideales de los biomoldes serían: la biocompatibilidad, la coincidencia de la cinética de degradación y formación de bioproductos; la similitud de propiedades estructurales y mecánicas; y el biomimetismo funcional y de composición (Murphy and Atala 2014; Tamadon et al. 2016). Como se puede observar en la Tabla I los tejidos acelulares cumplen más propiedades que los biomateriales, y de hecho ya han demostrado tener una gran capacidad de regeneración en varios órganos (Tamadon et al. 2016). Esta tabla describe las ventajas y desventajas de los biomateriales frente a las matrices extracelulares (MEC), una compleja mezcla de proteínas estructurales y funcionales obtenidas después de la descelularización de un tejido. Concretamente los órganos reproductivos debido a la especificidad de las funciones que desempeñan, conllevan una dificultosa elaboración artificial de sus MEC. Tales conocimientos han sido aplicados al campo de la medicina reproductiva, utilizando las

matrices descelularizadas y sin antígenos que puedan provocar un rechazo inmune, como plataformas regenerativas para su recelularización (RC) con diferentes tipos de células (Campo, Baptista et al. 2017; Taylan and Oktay 2017; Peng et al. 2017).

El objeto de esta revisión es dar una visión general de los recientes avances en MR e IT en la medicina reproductiva a partir del uso de órganos descelularizados y a sus posibles aplicaciones clínicas.

PROTOCOLOS DE DESCELULARIZACIÓN

La descelularización (DC) fue definida por Badylack et al. como la *"eliminación eficiente del material celular y nuclear de un tejido minimizando cualquier efecto adverso sobre la composición, actividad biológica e integridad mecánica de la matriz extracelular (MEC) restante"*. Si el proceso se hace correctamente, tales características pueden ser mantenidas en el tiempo incluso después de una esterilización y largo almacenamiento. La preservación de la red vascular también es crítica ya que se necesita de un sistema circulatorio para recelularizar el órgano (Campo, Baptista et al. 2017; Peng et al. 2017).

	Biomateriales		Tejidos acelulares
	Sintéticos	Naturales	
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> -Algunos son biodegradables (remodelados por la MEC). - Fácil disponibilidad con adecuación a características, propiedades mecánicas y microestructuras determinadas. - Mantienen la resistencia (Tensile strength). - Diversas formas de aplicación (moldes, fibras, hidrogeles o microesferas...). 	<ul style="list-style-type: none"> - Reconocimiento biológico. - Buena biocompatibilidad. - Componentes semejantes a las MEC humanas. - Bioactividad inherente. 	<ul style="list-style-type: none"> - No necesidad de inmunosupresores. - Baja tasa de infecciones secundarias. - Arquitectura específica del órgano o tejido (ultraestructura). - Alta preservación de la composición de la MEC. - Presencia de biomoléculas bioactivas, importantes para la regeneración del tejido, en la MEC.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Necesidad de inmunosupresores. - Alta tasa de infecciones secundarias. - Poca biocompatibilidad. - Ausencia de sitios de reconocimiento molecular. - Mala mimetización con la estructura natural de los tejidos. - Pérdida de las propiedades mecánicas y producción de productos tóxicos durante su biodegradación. - Capacidad disminuida de inducir remodelación celular y tisular. - Pobre hidrofobicidad superficial. - Elevada heterogeneidad de materiales debido a la mala propagación celular. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necesidad de inmunosupresores. - Posibilidad de contaminación patógena según el donante. - Requerimiento de procedimientos de purificación. - Mala mimetización de la estructura natural de los tejidos. - Rango de propiedades fisicoquímicas. - Variabilidad entre lotes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Residuos celulares no eliminados pueden tener efectos adversos en el receptor. - Posible respuesta inmune significativa debido a diferencias en la estructura primaria de las proteínas residuales en la MEC, en el uso de xenoinjertos. - Posibles variaciones de la materia prima de aloinjerto entre lotes. - Posible alteración estructural de la MEC en la descelularización.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la utilización de biomateriales sintéticos frente a matrices extracelulares (tejidos acelulares) obtenidas tras proceso de descelularización de los órganos de interés (Murphy and Atala., 2014; Tamadon et al., 2016)

Los protocolos de DC varían en relación al órgano de interés ya que la eficiencia de los procesos depende del tejido y de los métodos que se utilicen (Peng et al. 2017; Young and Goloman 2013). El primer paso generalmente es la lisis de

la membrana celular a partir de técnicas físicas o soluciones iónicas, seguido por la separación celular de los componentes de la MEC, utilizando reacciones enzimáticas, y la solubilización de los elementos celulares usando

detergentes (iónicos o no iónicos). Todo ello puede ir acoplado a mecanismos de agitación para incrementar su efectividad (Gilbert et al. 2006). Durante los protocolos las proteasas liberadas pueden causar daño en la MEC

Garantizar la eficiencia del proceso	Evaluar la estructura final
<ul style="list-style-type: none"> • Estructuras nucleares: Detección con tinciones histológicas (H&E, Masson's Trichome, Movat's..) • Proteínas intracelulares: Detección (inmunohistoquímicas) • Presencia de ADN: Detección con tinciones fluorescentes (DAPI o Hoechst), cuantificación (Yoduro de Propidio, PicoGreen, Nanodrop).. 	<ul style="list-style-type: none"> • Test mecánico: Espesor de la muestra y prueba de tracción uniaxial • Proteínas estructurales: Detección (inmunohistoquímicas) o cuantificación (ensayo de hidroxiprolina o azul de dimetilmileno) • Ultraestructura : Microscopía electrónica SEM y TEM

Santoso et al.,2014			
Protocolos	P1- SDS	P2-HPP	P3-Tritón X-100
Condiciones	0.1% SDS/PBS - 1h 1% SDS/PBS - 1h 1% SDS/PBS - 2h	T: 10 uC o 30 uC Pr: 65.3-196.13MPa/min	1% Tritón X-100/PBS 24h 3% Tritón X-100/PBS 24h 3% Tritón X-100/ PBS 48h
Lavado	Tampón NaCl 0.9%, hexahidrato de cloruro de magnesio 0.05M. ADNasaI 0.2mg/ml, penicilina y estreptomina 1% durante 1 semana a 4°C en un agitador a frecuencia 1Hz		
Resultados	R1	R2	R3
Residuos celulares	0.1% SDS/PBS - 1h > 1% SDS/PBS - 1h > 1% SDS/PBS - 2h	Eliminación completa de las células del músculo liso y el estroma pero no de las capas epiteliales	
Contenido de colágeno	Reducción	Reducción	Mucha reducción
Miyazaki and Maruyama., 2014			
Condiciones	0.01% SDS/dH ₂ O - 24h 0.1% SDS/dH ₂ O - 24h 1% SDS/dH ₂ O - 24h T:4°C		
Lavado	Perfusión inicial vía aorta de PBS 50ml/h Perfusión final con dH ₂ O 15min y Tritón X-100 al 1% 30 min finalizando con un lavado de PBS		
Resultados	Descelularización completa de la matriz y conservación de ls componentes de la MEC y la red vascular.		
Hellström et al.,2014			
Protocolos	P1	P2	P3
Condiciones	4% DMSO/PBS+A -4h 1% TritónX100/PBS+A -4h PBS+A - 30min Repetir 4 veces	5 Ciclos del P1 combinado PBS por dH ₂ O y añadiendo un paso de C/D(-80°C y 37°C) entre los ciclos 2 y 3	2% SDC/dH ₂ O+A - 6h dH ₂ O+A - 2h Lavado Repetir 4 veces
Lavado	PBS+A overnight	dH ₂ O+A overnight	dH ₂ O+A overnight
Resultados	R1	R2	R3
Residuos ADN	31.8 ng ADN/ mg tejido	1.3 ng ADN/ mg tejido	6.2 ng ADN/ mg tejido
Contenido de colágeno y Vascularización	Conservado	Conservado	Conservado
SEM y TEM	E. Compacta	E. Compacta	E. Porosa
Campo, Baptista et al., 2017			
Condiciones	Evaluación de un paso de C/D antes de empezar el ciclo: 0.1% SDS 18h, dH ₂ O 30min, 1% Tritón X-100 30min i PBS 5h. Repetir 2 veces.		
Lavado	Perfusión inicial vía cuerno uterino con PBS durante 1h		
Resultados	No hubo diferencias con o sin el paso de C/D. Eficiente descclularización y preservación de la red vascular.		

Tabla 2. Métodos y técnicas para garantizar la efectividad de los procesos de descclularización y la conservación de las características de la matriz extracelular (Campo, Baptista et al. 2017; Santoso et al., 2014).

por lo que deben incluirse inhibidores de proteasas y mantener la temperatura y el pH controlados. Para disminuir las contaminaciones es habitual incluir soluciones antibióticas y finalmente eliminar los residuos químicos del tejido antes de la RC y trasplante, ya que, en altas concentraciones, podrían causar una reacción adversa en el receptor (Gilbert et al. 2006).

Este proceso se deberá acompañar de análisis adecuados para garantizar su efectividad y la conservación de las características de la estructura final. Existen muchos métodos para ello, tal como se muestra en la Tabla II. Pequeñas concentraciones de restos celulares en la MEC no se han correlacionado con una respuesta adversa en el receptor. Aun así, según Crapo et al. el mínimo criterio a satisfacer es: <50 ng de ADN por mg de MEC peso seco, <200 pb ADN longitud de los fragmentos y además falta de material nuclear visible en tinciones DAPI o Hematoxilina & Eosina (Crapo et al. 2011; Gilbert et al. 2006).

APLICACIONES DE LA MEDICINA REGENERATIVA BASADA EN LA BIOINGENIERÍA

Útero

El útero es un órgano muscular que se divide en cérvix, istmo, cuerpo y fondo. Formado por tres capas: el perimetrio, principalmente tejido conectivo, el miometrio, tejido muscular, y el endometrio, epitelio columnar parcialmente ciliado acompañado de estroma. Este órgano reproductivo es muy sensible a la producción hormonal de los ovarios y varía tanto en la composición del endometrio como en su comportamiento (contracciones) a lo largo del ciclo menstrual. Todas estas características hacen que su MEC sea especialmente difícil de imitar aun siendo el órgano reproductivo más estudiado respecto a su funcionalidad (Tamadon et al. 2016).

En 2005 Alborzi et al. utilizaron un injerto peritoneal y un soporte de plástico para tratar la aplasia cervical en humanos. Estudios semejantes se han hecho con submucosa del intestino delgado, células cervicales y con

biomateriales sintéticos pero todavía ningún constructo ha sido testado bajo condiciones de embarazo (Campo, Cervelló et al. 2017; Kuo et al. 2017; Tamadon et al. 2016).

Los primeros intentos para desarrollar endometrios con estructuras 3D fueron llevados a cabo por Bentin-Ley et al., Schutte et al. o MacKintosh et al., a partir de matrices sintéticas o derivadas de otros compuestos humanos llegando a imitarse su compleja arquitectura e incluso la menstruación, pero sin resultar óptimos para uso *in vivo*. Otros muchos estudios han intentado mejorar los resultados sobre todo en cuanto a similitud estructural (Campo, Cervelló et al. 2017). Recientemente Olalekan et al. establecieron un nuevo modelo 3D de endometrio *in vitro* que responde a un ciclo de 28 días de hormonas esteroideas ováricas con la expresión de receptores de estrógeno y progesterona y una respuesta de decidualización proporcionando un novedoso sistema para estudiar la acción hormonal sobre la angiogénesis, la receptividad endometrial y la implantación (Olalekan et al. 2017). Lu et al. demostraron que es posible llevar a cabo el desarrollo temprano de embriones en un co-cultivo estratificado de endometrio y miocitos sobre una capa de matrigel de colágeno (Steinberg et al. 2015). Y Young y Goloman dirigieron sus esfuerzos a reparar una fracción de pared uterina a partir de células de miometrio cultivadas en MEC de miometrios humanos y de rata DC. (Campo, Cervelló et al. 2017; Kuo et al. 2017; Young and Goloman 2013).

Los conocimientos adquiridos con todos esos estudios hicieron posible el hecho de regenerar el tejido uterino, *in vivo*, a partir de injertos cultivados sobre moldes construidos normalmente con materiales sintéticos o naturales, llegando a obtener tasas de embarazo del 77.8% e incluso viendo implantaciones de embriones en los injertos (Ding et al. 2014). Aunque estas matrices artificiales constan de reconocimiento biológico, no se ha conseguido imitar totalmente la estructura del tejido uterino y su capacidad regenerativa es dependiente del tejido nativo existente. Otra posibilidad serían los trasplantes de

órgano íntegro pero descelularizados, así como la utilización de injertos de tejido uterino acelular, una alternativa que podría mejorar mucho los resultados y a la vez saltar ciertos obstáculos como la inmunosupresión (Campo, Baptista et al. 2017; Kuo et al. 2017; Santoso et al. 2014).

Bastantes grupos han descrito el procedimiento de DC y RC de todo el órgano en modelos animales (Campo, Cervello et al. 2017). En 2014 Santoso et al., compararon la efectividad de tres métodos de DC, representados en la Tabla III, en trompas de Falopio de rata y estudiaron el comportamiento de estos tejidos *in vivo*. Los resultados mostraron que con alta presión hidrostática (HHP) se pueden estandarizar las condiciones de DC porque son independientes del tamaño y la estructura de la muestra. Además, este sistema causa una desnaturalización de proteínas mínima en contraste con los detergentes, lo que resulta en la mejor preservación del contenido de MEC (Figura 1 apartado A). Se observó regeneración de los tejidos uterinos, específicamente en el grupo HHP, además de respuesta hormonal y propiedades mecánicas que revelaron el potencial de los úteros reconstruidos para comportarse como un útero nativo. En las pruebas de fertilidad hubo embarazo en los grupos de dodecilsulfato sódico (SDS) y HHP, concluyéndose este último como la mejor opción (Santoso et al., 2014). Ese año Miyazaki y Maruyama consiguieron la DC completa de útero, en rata, con la conservación de los componentes de la MEC y la red vascular, usando un sistema de perfusión vía aorta, Tabla III. Demostraron RC *in vitro* con la consiguiente reconstrucción de un endometrio funcionalmente competente y tasas de embarazo del 75% (Miyazaki and Maruyama., 2014). Por su parte Hellström et al., compararon tres protocolos de DC de útero de rata basados en el uso de diferentes detergentes, Tabla III. La inmunohistoquímica mostró que todos los protocolos utilizados eliminaron con éxito los elementos inmunorreactivos MHC clase I y II. No se detectaron diferencias importantes en el contenido ni distribución del colágeno entre los moldes, pero sí en elastina y

Tabla 3 - Figura 1

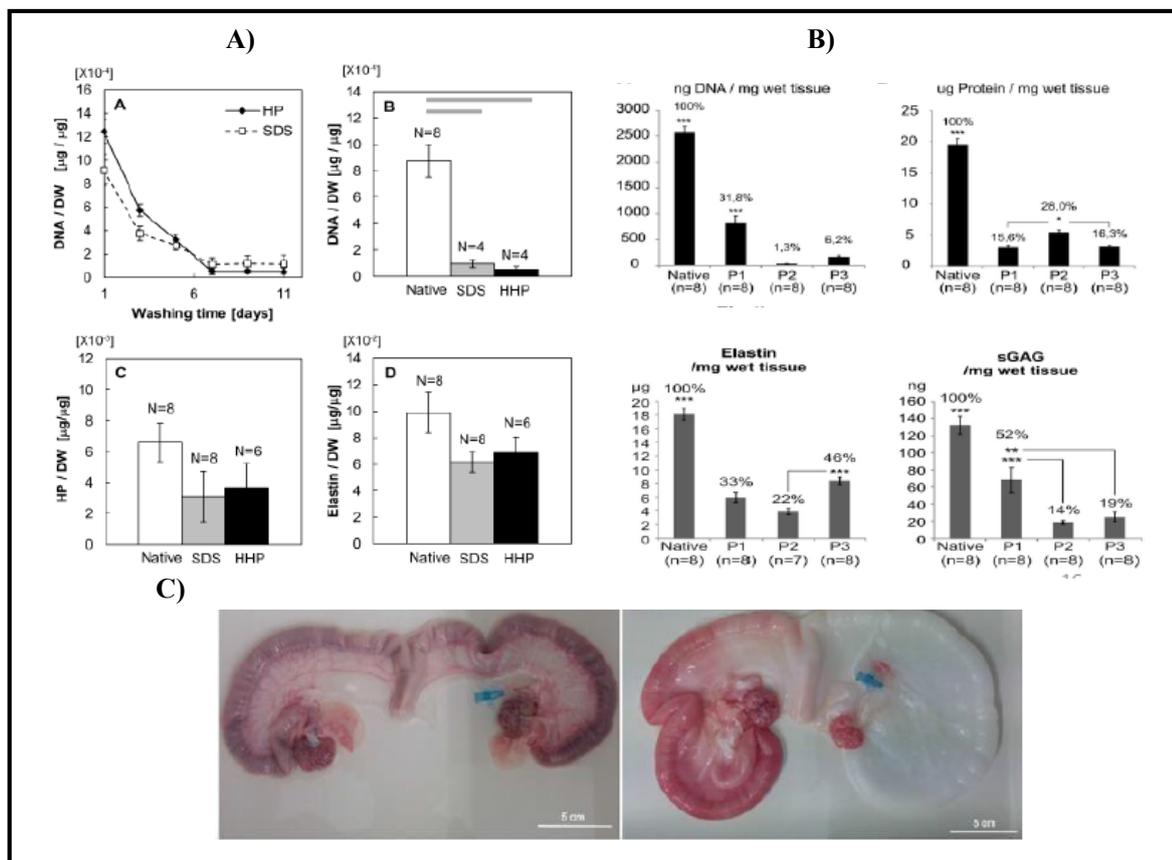


Tabla 3. Detalle de 4 protocolos de descelularización de útero y sus resultados. T: Temperatura, Pr: Presión, SDS: Dodecilsulfato sódico, HPP: Alta presión hidrostática, dH2O: Agua destilada, A: Ácida sódica, C/D: congelación/descongelación (Santoso et al.,2014; Mizayaki y Maruyama 2014; Hellstrom et al. 2014; Campo, Baptista et al.,2017).

Tabla 3 - Figura 1. Técnicas y protocolos de descelularización de útero A) El protocolo con alta presión hidrostática (HHP) elimina mejor el ADN y desnaturaliza mínimamente las proteínas de la MEC en contraste con la utilización de SDS, sin dejar residuos químicos (Santoso et al., 2014) B) La cuantificación del ADN sugirió propiedades de DC para la dH2O como reactivo tamponador. No se detectaron diferencias importantes en el contenido ni distribución del colágeno entre los moldes, pero sí en elastina y glicosaminoglicanos (Hellström et al.,2014). C) Útero antes y después de la descelularización (Campo, Baptista et al., 2014)

glicosaminoglicanos (GAGs). Los análisis de microscopía electrónica revelaron que los constructos más resistentes, según los experimentos mecánicos, contaban con una estructura de MEC porosa. Los protocolos que demostraron ser superiores en la eliminación de ADN y, en general, fueron menos nocivos para la MEC fueron señalados como candidatos prometedores para futuras aplicaciones de bioingeniería del útero, Figura 1 apartado B. (Hellström et al., 2014)

Los tratamientos explicados anteriormente generan cambios en las MEC que pueden tener un cierto impacto en su funcionalidad por lo que se debería tratar de establecer cuál es

el mejor protocolo para su aplicación *in vivo* (Hellstrom et al. 2017). Con esta motivación los dos grupos anteriores evaluaron conjuntamente la capacidad regenerativa de injertos uterinos obtenidos a partir de la RC de matrices uterinas que habían sido DC con los protocolos mencionados previamente. Los resultados corroboraron los del estudio anterior, mostrando que los injertos obtenidos mediante uno de los protocolos más prometedores regeneraban mejor e incluso fueron capaces de desarrollar fetos a corto plazo en los sitios de trasplante aunque la placentación nunca ocurrió directamente sobre los injertos, posiblemente debido a una estructura de tejido subóptima y/o revascularización

deficiente (Hellstrom et al. 2016).

En 2017 Campo et al. desarrollaron un protocolo de DC, Tabla III, de todo el útero porcino consiguiendo una eficiente eliminación de los restos celulares sin diferencias visibles entre los protocolos estudiados. La estructura 3D se mantuvo, así como la red vascular, Figura 1 apartado C. También se observó una correcta RC y regeneración de células endometriales, demostrando la posibilidad de aumentar el tamaño de los órganos descelularizados y permitiendo la posibilidad de crear un órgano funcional (Campo, Baptista et al., 2017).

Vagina

La vagina forma parte de los órganos sexuales externos que intervienen en el coito. Su estructura se compone de tejido epitelial, muscular y una matriz con proteínas estructurales como colágeno, elastina...

Para pacientes que sufren aplasia vaginal la bioingeniería hace posible la creación, *ex vivo*, de construcciones que desempeñan una función sexual normal y mantienen adecuadamente la apariencia de genitales externos (Campo, Cervelló et al. 2017; Peng et al. 2017). Sin embargo, la mayoría de las alternativas disponibles incluyen procedimientos quirúrgicos y el uso de tejidos no-genitales. Los tejidos usados como sustitutos pueden tener una adecuada regeneración y función epitelial pero normalmente disponen de una capa muscular anormal dificultando la recuperación normal de la función de este órgano (De Filippo et al. 2003; Murphy and Atala 2014). El primer caso de un trasplante vaginal, con moldes 3D, en humanos fue publicado por Raya-Rivera et al. Segmentos comerciales de submucosa intestinal acelular se sembraron con células autólogas obtenidas de pacientes con ausencia congénita de vagina y con ellas se recubrieron los moldes de copolímero diseñados específicamente para cada paciente. Seis meses después de la operación los tejidos reconstruidos se mostraron similares a los nativos en características físicas, perfiles de expresión de proteínas y organizaciones celulares (Raya-Rivera et al. 2014). Estos resultados fueron posibles porque se basan en la experiencia previa de pruebas experimentales *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y la utilización de las MEC de otros órganos descelularizados (De Filippo et al. 2003; Peng et al. 2017).

Ovarios

Los ovarios son los órganos sexuales primarios responsables de la producción de los óvulos y la secreción endocrina de hormonas y otros péptidos. Es muy importante su flexibilidad y adaptabilidad ya que su tamaño varía dentro del ciclo menstrual y la

paridad de la mujer además de sufrir mensualmente roturas relacionadas con la ovulación. Su estructura histológica consiste en cuatro capas: el epitelio germinativo, la túnica albugínea, la corteza que contiene los folículos ováricos, y la médula (Tamadon et al. 2016).

Para las pacientes que se enfrentan a un cáncer es primordial salvaguardar una gran población inactiva de folículos primordiales antes de iniciar los tratamientos. Se han descrito diferentes estrategias para ello siendo una de ellas la criopreservación y trasplante de tejido ovárico cuyo principal inconveniente recae en el fenómeno conocido como "burnout" producido por una isquemia inicial, pero también existe el riesgo de reintroducir células malignas en el paciente a partir del tejido trasplantado (Laronda et al. 2015; Taylan and Oktay 2017). Por ello, en las últimas décadas, numerosos equipos de investigación han trabajado en el desarrollo de dos estrategias para evitar o disminuir tal riesgo: el ovario *in vitro* y el ovario artificial trasplantable. (Díaz-García and Herraiz 2014; Telfer and Fauser 2016).

Construir un ovario podría restaurar las funciones sistémicas mejor que la terapia hormonal de reemplazo, además se beneficiaría a pacientes con opciones limitadas (prepuberales o con cánceres hormonodependientes) (Laronda et al. 2015). Pero la dificultad del cultivo folicular recae en que en las diferentes etapas de maduración los folículos van cambiando sus necesidades en términos de estímulos paracrinos, tanto bioquímicos como mecánicos (Díaz-García and Herraiz 2014). Además, la imitación de la MEC ovárica es fundamental para promocionar su desarrollo y recuperación (Laronda et al. 2015, Tamadon et al. 2016).

Muchos estudios desarrollaron sistemas de cultivo 3D con materiales sintéticos como Pangas et al., 2003 o Xu et al., pero fue Krotz S.P. et al. quien consiguió, en humanos, la maduración desde folículo antral temprano a ovocitos metafase II en geles de agarosa. Otros estudios que incorporan componentes como colágeno (tipo I y IV), fibrina y/o

fibronectina en la MEC han demostrado un crecimiento, diferenciación y competencia meiótica mejorados en comparación con las matrices sintéticas (Kuo et al. 2017; Luyckx et al. 2014; Amorim and Shikanov 2016). Una vez más, la mejor alternativa a la utilización de biomateriales es la DC del órgano despojándolo de las células cancerígenas. Partiendo de esta hipótesis se puede recurrir a dos enfoques: el primero implica la DC y RC del órgano completo antes de la implantación (Jakus et al. 2017). Laronda et al., descelularizaron ovarios bovinos y humanos y después de volver a sembrarlos con células ováricas somáticas se observó que producían estradiol e inhibina A *in vitro*. Además, los injertos recelularizados iniciaron la pubertad en ratones que habían sido ovariectomizados, sugiriendo que podrían tener implicaciones más amplias en la bioingeniería de otros órganos con función endocrina (Martínez and *International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM Expert Working Group* 2017). Los resultados fueron satisfactorios, sin embargo, no se consiguió la RC completa del órgano ni hubo descendencia viable (Laronda et al. 2015). Liu et al., diseñaron un nuevo protocolo para la DC de tejido ovárico de cerdo acortando el tratamiento con SDS para minimizar el daño en la ultraestructura del tejido nativo. Además de una correcta repoblación del tejido y secreción de estradiol, se observó una respuesta inmune mínima en los injertos (Liu et al. 2017). Aunque prometedor, este enfoque todavía adolece de una variedad de deficiencias técnicas y prácticas que incluyen la incapacidad de recelularizar completamente los órganos consiguiendo una total funcionalidad y la necesidad de órganos completos y viables que estén disponibles para la DC inicial.

El segundo enfoque, utilizado por Jakus et al., se basaba en un proceso altamente versátil para crear biomateriales llamados "Tissue paper" (TP). Estos se componen en un 65% de componente bioactivo natural, de manera que mantienen parte de la estructura nativa y de las características mecánicas del tejido original, y en un 35% de polímero,

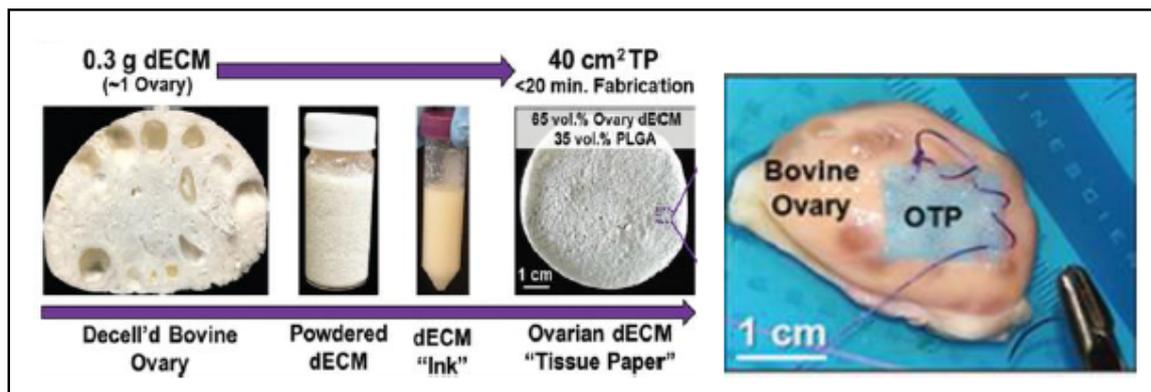


Figura 2. Creación de biomateriales llamados “Tissue Paper” a partir de matrices ováricas descelularizadas que son liofilizadas y mezcladas con biomateriales. Éstos pueden ser útiles en infusiones de andamios, impresiones 3D o parches asegurando injertos corticales. (Jakus et al., 2017)

presente principalmente para ayudar en el procesamiento y la manipulación. Podrían usarse para impresiones en 3D, para la implantación quirúrgica de folículos individuales, actuar como un parche asegurando injertos de tejido cortical o en trasplantes de órgano completo (Figura 2). Se investigó la viabilidad y la función *ex vivo* de los folículos ováricos aislados de ratón y trozos de corteza ovárica cultivados en TP demostrando que se puede mantener la viabilidad tisular y la función hormonal (Jakus et al., 2017). Esta aplicación de los TP recuerda al estudio de Taylan y Oktay en el que se describe la aplicación innovadora de estructuras tridimensionales descelularizadas como una plataforma regenerativa para la reconstrucción de injertos ováricos para autotrasplante (Taylan and Oktay 2017).

CONCLUSIÓN

Los tejidos descelularizados han demostrado ser prometedores sustitutos funcionales de los biomateriales hasta el punto de ser actualmente esenciales en la IT. Además, la baja respuesta inmune de las MEC las convierte en ideales para su uso tanto en alocomo xeno-trasplantes por tener los componentes de la matriz altamente conservados entre especies.

En medicina reproductiva estas nuevas técnicas también se están llevando a cabo con resultados muy prometedores: respecto al endometrio se ha conseguido la construcción de moldes acelulares 3D sensibles a hormonas *in vitro*, los trabajos con miometrio han demostrado la utilidad de los parches uterinos y

se han utilizado soportes sintéticos, naturales e incluso recelularizados con células de otros órganos para tratar la aplasia cérvico-vaginal. Gracias a los conocimientos adquiridos con todos estos estudios, ha sido posible regenerar tejido uterino, *in vivo*, a partir de tejido acelular y desarrollar un protocolo de DC para un órgano reproductor grande manteniendo su estructura 3D, dando opción a futuros trasplantes de útero íntegros, lo que podría evitar la inmunosupresión como tratamiento de los pacientes. La IT también puede ofrecer una solución para la reconstrucción vaginal cuando se dispone de poco tejido local, con el uso de tejido autólogo, de otros órganos, descelularizado. Por otra parte, el desarrollo de un ovario artificial es una alternativa valiosa para restaurar la fertilidad y las funciones sistémicas en pacientes puntuales sin necesidad de inmunosupresión y disminuyendo el riesgo de reintroducción de células cancerígenas. Además, podría usarse en estudios de toxicología para evaluar el impacto de diferentes fármacos y sustancias químicas sobre la supervivencia y el desarrollo de los folículos, así como sobre la calidad de los ovocitos. Se concluye la necesidad de más estudios *in vivo* con la DC del órgano completo demostrando la función fisiológica de los ovarios finalizando en una gestación para que esta estrategia se utilice en trasplantes humanos.

Finalmente, el reciente descubrimiento de la posibilidad de solubilizar y manipular MEC para formar hidrogeles y TP ha dado paso a investigaciones *in vitro* e *in vivo* para intentar entender

sus propiedades mecánicas y evaluar cómo éstos influyen en el control de la diferenciación y comportamiento celular además de la remodelación del tejido *de novo*. Los resultados actuales prevén una expansión de sus utilidades clínicas en un futuro al utilizarse como plataformas regenerativas, ya sea en forma de injerto o de órgano completo creado a partir de una impresión 3D, disminuyendo el *burnout* al reducir la isquemia inicial, facilitando la maduración folicular y la RC o mejorando la sujeción de diferentes órganos (Saldin et al. 2017). Aun así, quedan muchos obstáculos que sobrepasar para la completa sustitución de los tejidos reproductivos, entre ellos la optimización de protocolos de DC y RC de los diferentes órganos completos. Por ello, los estudios actuales se centran cada vez más en comparar protocolos que una vez establecidos en animales podrían dar paso a estudios clínicos en humanos.

CONFLICTO DE INTERESES

La autora no tiene ningún conflicto de intereses para declarar.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a la Dra. Irene Cervelló su generosa asistencia y discusión.

BIBLIOGRAFÍA

Amorim CA and Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol* 2016;12:2323-2332.

- Campo H, Baptista PM, Lopez-Perez N, Faus A, Cervello I and Simon C. De- and recellularization of the pig uterus: a bioengineering pilot study. *Biol Reprod* 2017;96:34-45.
- Campo H, Cervello I and Simon C. Bioengineering the Uterus: An Overview of Recent Advances and Future Perspectives in Reproductive Medicine. *Ann Biomed Eng* 2017;45:1710-1717.
- Crapo PM, Gilbert TW and Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011;32:3233-3243.
- De Filippo RE, Yoo JJ and Atala A. Engineering of vaginal tissue in vivo. *Tissue Eng* 2003;9:301-306.
- Diaz-Garcia C and Herraiz S. The artificial ovary: any new step is a step forward. *Fertil Steril* 2014;101:940.
- Ding, L., X. Li, H. Sun, J. Su, N. Lin, B. Peault, T. Song, J. Yang, J. Dai, and Y. Hu. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on collagen scaffolds for the functional regeneration of injured rat uterus. *Biomaterials* 2014;35:4888-4900.
- Gilbert TW, Sellaro TL and Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-3683.
- Hellstrom M, Bandstein S and Brannstrom M. Uterine Tissue Engineering and the Future of Uterus Transplantation. *Ann Biomed Eng* 2017;45:1718-1730.
- Hellström M, El-Akouri R, Sihlbom C, Olsson B, Lengqvist J, Bäckdahl H, et al. Towards the development of a bioengineered uterus: comparison of different protocols for rat uterus decellularization. *Acta biomaterialia* 2014;10:5034-5042.
- Hellstrom M, Moreno-Moya JM, Bandstein S, Bom E, Akouri RR, Miyazaki K, et al. Bioengineered uterine tissue supports pregnancy in a rat model. *Fertil Steril* 2016;106:487-496.e1.
- Jakus AE, Laronda MM, Rashedi AS, Robinson CM, Lee C, Jordan SW, et al. "Tissue Papers" from Organ-Specific Decellularized Extracellular Matrices. *Adv Funct Mater* 2017;27:10.1002/adfm.201700992. Epub 2017 Aug 7.
- Kakabadze Z, Kakabadze A, Chakhunashvili D, Karalashvili L, Berishvili E, Sharma Y and Gupta S. Decellularized human placenta supports hepatic tissue and allows rescue in acute liver failure. *Hepatology* 2017:.
- Kuo CY, Baker H, Fries MH, Yoo JJ, Kim PCW and Fisher JP. Bioengineering Strategies to Treat Female Infertility. *Tissue Eng Part B Rev* 2017;23:294-306.
- Laronda MM, Jakus AE, Whelan KA, Wertheim JA, Shah RN and Woodruff TK. Initiation of puberty in mice following decellularized ovary transplant. *Biomaterials* 2015;50:20-29.
- Liu WY, Lin SG, Zhuo RY, Xie YY, Pan W, Lin XF and Shen FX. Xenogeneic Decellularized Scaffold: A Novel Platform for Ovary Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 2017;23:61-71.
- Luyckx V, Dolmans MM, Vanacker J, Legat C, Fortuno Moya C, Donnez J and Amorim CA. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril* 2014;101:1149-1156.
- Martinez F and International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM Expert Working Group. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation-ESHRE-ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertil Steril* 2017;108:407-415.e11.
- Miyazaki K and Maruyama T. Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *Biomaterials* 2014;35:8791-8800.
- Murphy SV and Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 2014;32:773-785.
- Olalekan SA, Burdette JE, Getsios S, Woodruff TK and Kim JJ. Development of a novel human recellularized endometrium that responds to a 28-day hormone treatment. *Biol Reprod* 2017;96:971-981.
- Peng G, Liu H and Fan Y. Biomaterial Scaffolds for Reproductive Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 2017;45:1592-1607.
- Raya-Rivera AM, Esquiliano D, Fierro-Pastrana R, Lopez-Bayghen E, Valencia P, Ordorica-Flores R, et al. Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *Lancet* 2014;384:329-336.
- Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ and Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater* 2017;49:1-15.
- Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, Aizawa M, Yoshino O, Kishida A, et al. Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. *PLoS One* 2014;9:e103201.
- Steinberg M, Siegersma K, Roth E and Marsh E. Decoding the matrix: using an optimal decellularization protocol to characterize the leiomyoma and myometrium extracellular matrix (ECM). *Fertil Steril* 2015;104:e102-e103.
- Tamadon A, Park K, Kim YY, Kang B and Ku S. Efficient biomaterials for tissue engineering of female reproductive organs. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2016;13:447-454.
- Taylan E and Oktay K. Application of Decellularized Tissue Scaffolds in Ovarian Tissue Transplantation. *Methods Mol Biol* 2017:.
- Telfer EE and Fauser BC. Important steps towards materializing the dream of developing an artificial ovary. *Reprod Biomed Online* 2016;33:333-334.
- Young RC and Goloman G. Allo- and xeno-reassembly of human and rat myometrium from cells and scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2013;19:2112-2119.



llama ahora al
944 354 600
e infórmate

Teléfono exclusivo para
Asociados comercializado
por Segurmec

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

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

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

ASEBIR Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

MEJORAR EL PRECIO DE TUS SEGUROS. ESE ES NUESTRO RETO.

Oferta exclusiva* para ti y tus familiares directos por estar asociado a ASEBIR, te garantizamos un precio mejor para tus seguros de coche, moto, hogar, comercios y comercios + hogar.
¡Llama ahora y **paga menos por tus seguros!**

Rétanos en el
913 278 992
www.zurich.es/colegiosprofesionales



RETO ZURICH seguros

Oferta exclusiva para

ASEBIR Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción



ZURICH[®]

*La mejora de precio será de un 5% respecto al precio de renovación presentado a Zurich. Promoción válida para nuevas contrataciones (realizadas entre el 1 de febrero de 2018 y el 31 de diciembre de 2018) de póliza de: 1) Auto (turismos o furgonetas de uso particular) en la modalidad de Terceros completo con y sin Pérdida Total o Todo Riesgo con franquicia con pago anual y con tomador, conductor y/o propietario con al menos 5 años de carné. 2) Hogar con las coberturas de contenido y continente. 3) Negocios. Para la mecánica y demás condiciones, y promociones para otras modalidades/productos, consulta las bases en <http://colectivos.zurich.es/promocion2018>. No acumulable a otras promociones. Producto intermediado por SegurMec Correduría de Seguros, S.L. DGSFP J1281. El corredor recomienda estos productos sobre la base del análisis objetivo previsto en la Ley de Mediación de seguros y reaseguros privados. Estos productos pertenecen a Zurich Insurance plc, Sucursal en España.

LA DOBLE CARA DE LA ZONA PELÚCIDA

THE DOUBLE FACE OF THE ZONA PELLUCIDA

Ana Guerrero Mayo. Nuria Soler Balaguer.

Centro de formación "IVI Learning Center" Calle Guillem de Castro, 9, 46007 Valencia

anaguerreromayo@gmail.com

RESUMEN: La Zona Pelúcida (ZP) es una matriz glicoproteica translúcida que rodea al ovocito de los mamíferos y que se mantiene en el embrión preimplantacional hasta el estadio de blastocisto, observándose variaciones tanto en la estructura como en la funcionalidad comparada con la ZP ovocitaria. En humanos, está compuesta por 4 glicoproteínas designadas como ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 y presentan un patrón de glicosilación especie-específico que se considera fundamental para el reconocimiento gamético, la inducción de la reacción acrosómica y el bloqueo de la polispermia. Además, durante el desarrollo embrionario preimplantacional esta capa es esencial en la protección del embrión, la comunicación materno-cigótica, la prevención de la gemelaridad monocigótica mediante la unión de los blastómeros y la diferenciación de los blastómeros a trofoblasto (hipótesis de polarización). También juega un papel importante en la eclosión o hatching embrionario, cuyo proceso depende tanto de la acción mecánica y enzimática del blastocisto como la actividad lítica uterina. La disposición de los filamentos de la ZP permite el análisis de ésta por microscopía de polarización (PolScope) ya que le confiere una propiedad óptica denominada birrefringencia, permitiendo definir la estructura trilaminar que presenta. Debido a que la formación de la ZP depende del desarrollo folicular, las propiedades de la ZP humana podrían estimar la calidad del ovocito/embrión y, por tanto, la tecnología de PolScope se podría utilizar como herramienta clínica no invasiva para seleccionar los ovocitos/embriones de mayor calidad en una cohorte dada. También se ha propuesto la inmunización contra la ZP como método anticonceptivo, aunque siguen siendo necesarias más investigaciones para esclarecer los posibles efectos secundarios no deseados. Así, la ZP se convierte en un objeto de estudio de gran interés debido al doble papel que puede jugar en el panorama reproductivo actual.

Palabras clave: zona pelúcida (ZP), PolScope, estructura, función, birrefringencia, capas, glicoproteínas, inmunización

ABSTRACT: The zona pellucida (ZP) is a translucent glycoprotein matrix that surrounds the oocyte of mammals and is maintained in the preimplantation embryo until the blastocyst stage, observing variations in structure and functionality compared to oocyte ZP. In humans, it is composed of 4 glycoproteins designated as ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 and present a specific-glycosylation pattern that is considered fundamental for gametic recognition, the induction of the acrosome reaction and the blockade of polyspermia. In addition, during preimplantation embryonic development this layer is essential in embryo protection, maternal-zygomatic communication, the prevention of monozygotic twinning through the binding of blastomeres and the differentiation of blastomeres to trophoblast (polarization hypothesis). It also plays an important role in hatching or embryonic hatching, whose process depends on both the mechanical and enzymatic action of the blastocyst and uterine lytic activity. The arrangement of the filaments of the ZP allows the analysis of this by polarization microscopy (PolScope) since it confers an optical property called birefringence, allowing to define the trilaminar structure that it presents. Because the formation of the ZP depends on the follicular development, the properties of the human ZP could estimate the quality of the oocyte / embryo and, therefore, the PolScope technology could be used as a non-invasive clinical tool to select the oocytes / embryos of higher quality in a given cohort. Immunization against ZP has also been proposed as a contraceptive method, although more research is still needed to clarify possible unwanted side effects. Thus, the ZP becomes an object of study of great interest due to the double role it can play in the current reproductive panorama.

Keywords: zona pellucida (ZP), PolScope, structure, function, birefringence, layers, glycoproteins, immunization

INTRODUCCIÓN

La Zona Pelúcida (ZP) es una matriz glicoproteica extracelular que rodea al ovocito y se mantiene durante todo el desarrollo embrionario hasta la implantación en el endometrio. Se encarga de múltiples funciones tanto en el ovocito (previamente a la fecundación) como en el embrión hasta el estadio de blastocisto.

El análisis estructural de la ZP es posible gracias a la microscopía de polarización que se basa en la birrefringencia, una propiedad óptica única de moléculas altamente ordenadas como las fibras de la ZP, siendo indicativo de la densidad, la alineación de las moléculas y su grosor (Oldenbourg, 1999). Actualmente, uno de los campos de investigación en auge en reproducción asistida es la identificación de marcadores no invasivos que nos permitan identificar los mejores gametos y/o embriones para mejorar las tasas de implantación y embarazo. Así, el análisis de la ZP mediante el PolScope puede ser una herramienta clínica muy útil.

Por otro lado, completamente opuesto, también es de gran interés la búsqueda de nuevos tratamientos anticonceptivos que puedan mejorar los ya existentes para evitar los efectos secundarios que

producen los mismos. Debido a que la ZP es un elemento clave en la fecundación, se ha propuesto la inmunización contra sus proteínas para bloquear la interacción con el espermatozoide y así evitar el embarazo.

El objetivo de este trabajo es describir los aspectos estructurales y funcionales de la ZP tanto en el ovocito como en el embrión pre-implantacional y relacionar estas características con sus posibles aplicaciones en la clínica.

ESTRUCTURA DE LA ZP

En el ovocito

Las glicoproteínas de la ZP parecen ser secretadas coordinadamente por el ovocito durante la foliculogénesis, como se observa en el ratón (Soyal et al., 2000), mientras que hay evidencias en otras especies, incluida la humana, de que las células de la granulosa también contribuyen a la producción de dichas proteínas (Sinowitz et al., 2001). En los humanos la ZP tiene un espesor de aproximadamente 16 μm , rodea a un ovocito de un diámetro considerable (120 μm) y está compuesta por cuatro glicoproteínas: ZP1 (528 aa, 100 kD), ZP2 (602 aa, 75 kD), ZP3 (328 aa, 55kD) y ZP4 (444 aa, 65 kD) (Lefievre et al, 2004).

A nivel molecular, en el modelo murino, bastante aceptado para la mayoría de los mamíferos superiores, dos de las glicoproteínas, ZP2 y ZP3, interactúan entre sí formando unidades heterodiméricas que se disponen periódicamente en filamentos largos. Estos filamentos parecen estar interconectados por ZP1, la proteína más voluminosa de la ZP del ratón (Wassarman and Mortillo, 1991). Así, se constituye una capa que separa el oolema de la región más interna del folículo, la corona radiata. Prolongaciones celulares de esas células atraviesan la ZP y forman con la membrana plasmática del ovocito los puentes celulares (*gap-junction*) esenciales en la comunicación celular.

Como podemos observar en la figura 1, existe una marcada asimetría entre las capas externas y las internas de la ZP (Shalgi and Raz, 1997). La superficie externa, de apariencia amorfa y esponjosa, contiene poros de mayor tamaño que las capas internas, lo que facilita la penetración de los espermatozoides, así como de diferentes moléculas.

Gracias a la microscopía de polarización, fue posible analizar la ZP a nivel subestructural, mostrando una estructura trilaminar (Pelletier et al,

	Ovocitos inmaduros (n = 33)	Ovocitos maduros (n = 92)	Embriones día 3 (n = 83)
Capa 1			
Grosor (μm)	10.5 \pm 2.3	9.8 \pm 2.1 ^b	7.9 \pm 1.9
Retardancia (nm)	3.26 \pm 1.27	2.84 \pm 1.07	3.00 \pm 0.86
Capa 2			
Grosor (μm)	3.4 \pm 0.6	3.7 \pm 0.9	3.6 \pm 1.2
Retardancia (nm)	0.21 \pm 0.07 ^a	0.24 \pm 0.05 ^c	0.33 \pm 0.29
Capa 3			
Grosor (μm)	6.5 \pm 2.1	6.1 \pm 1.7 ^b	3.7 \pm 1.4
Retardancia (nm)	0.91 \pm 0.24	0.95 \pm 0.23 ^b	0.78 \pm 0.27
Zonal total			
Grosor (μm)	20.4 \pm 2.4	19.5 \pm 2.2 ^b	15.2 \pm 2.8

Tabla 1. Promedio y varianza del grosor y la retardancia medida en ovocitos y embriones individuales. (Adaptada de Pelletier et al, 2004) Nota: Los valores son la media \pm DE (one-tailed t-test; $P < 0.05$). a Diferencia estadísticamente significativa entre ovocitos inmaduros y maduros. b Disminución estadísticamente significativa entre ovocitos maduros y embriones en día 3. c Aumento estadísticamente significativo entre ovocitos maduros y embriones en día 3.

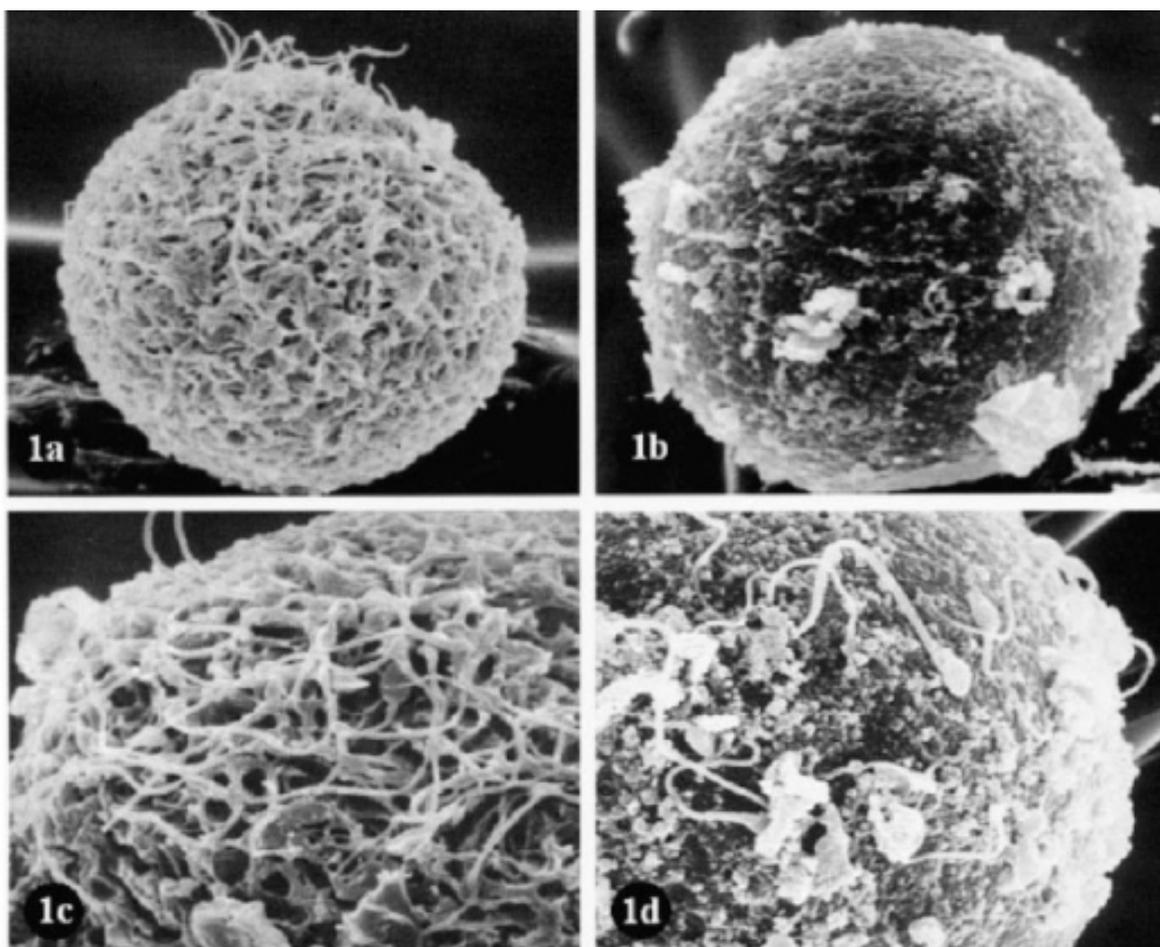


Figura 1. Análisis de la ZP por microscopía electrónica de barrido. (a) Ovocito humano no fecundado. Red porosa de la ZP (x2000). (b) Ovocito humano no fecundado. Superficie compacta y lisa de la ZP (x2000). (c) Mayor aumento de (a). La estructura porosa es evidente (x 4000). (d) Mayor aumento de (b). Se muestra una estructura densa y compacta (x 4000). Adaptada de Familiari et al, 2006.

2004). En el ovocito, los filamentos de la capa interna (capa 1) están orientados radialmente, mientras que los filamentos de la capa externa (capa 3) están orientados tangencialmente. Debido a esta organización bien estructurada, estas capas aparecen muy birrefringentes con el PolScope (Fig. 2). Las capas interna y externa están separadas por una capa intermedia (capa 2) que presenta una birrefringencia mínima, lo que sugiere una orientación aleatoria de los filamentos (Silva et al, 1997). Tanto en el ovocito como en el embrión temprano la capa más interna (capa 1) es la más gruesa y la que mayor retardancia exhibe, mostrando una mayor intensidad de brillo en el PolScope. La capa más externa (capa 3) es más delgada y exhibe menor retardancia que la capa 1, aunque es la capa intermedia (capa 2) la que presenta menor grosor y mínima retardancia.

En el embrión

La ZP de los embriones difiere significativamente tanto en el grosor como en la retardancia de las tres capas individualmente y en general, comparada con la ZP de los ovocitos maduros (Tabla I) (Pelletier et al, 2004).

La disminución del grosor general de la ZP de los embriones se debe sobre todo a la disminución de la capa más externa (capa 3) (Fig. 2E). Es bien conocido que los embriones en estadio de blastocisto tienen una ZP más delgada que los ovocitos (Balaban et al, 2002). Sin embargo, el grupo de Pelletier demostró que esa disminución ya está presente en estadio de segmentación, concretamente en día 3.

Es interesante señalar que se encontraron diferencias entre las capas

de la ZP humana entre los ovocitos y los embriones de una cohorte determinada. Gracias al marcado de epítopos de las proteínas de la zona se demostró que las capas de la zona se establecen en secuencia temporal, con la capa interna colocada en último lugar (Qi et al, 2002). Las diferencias regionales o espaciales en la producción enzimática o proteica dentro del ooplasma y el grado de unión de las células de la granulosa al ovocito podrían alterar la deposición de las proteínas de la zona, dando como resultado la variabilidad en los parámetros analizados de la ZP entre los ovocitos individuales (Pelletier et al, 2004).

FUNCIONES DE LA ZP

En el ovocito

Reconocimiento gamético, activación del ovocito y bloqueo espermático

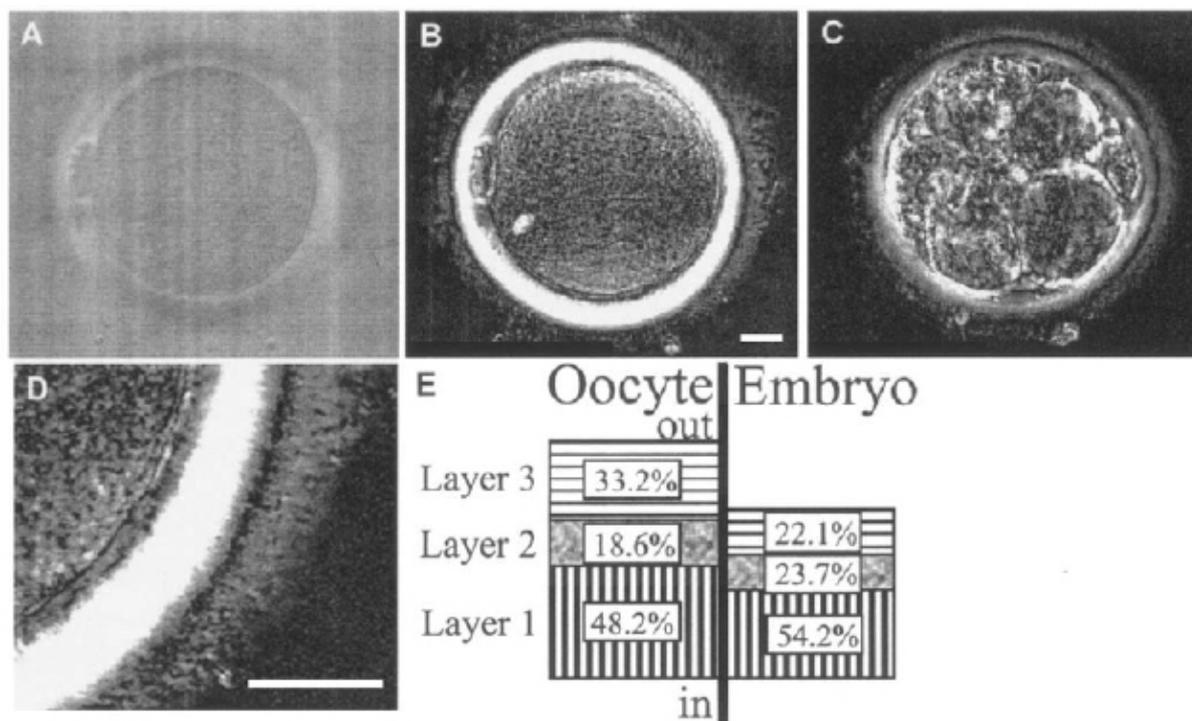


Figura 2. La estructura multilaminar de la ZP se puede cuantificar con PolScope. (A) Ovocito humano, fotografiado con óptica diferencial de contraste de interferencia y (B) con el PolScope. (C) Embrión en día 3 con microscopía PolScope. (D) El grosor y la retardancia de la ZP y cada una de sus capas se midieron con un sistema computarizado de análisis de imágenes (Spindle View 3.9) (E) Contribuciones de las capas individuales al grosor total de la ZP de los ovocitos y los embriones en día 3. Barras de escala = 20 μ m. Adaptada de Pelletier et al, 2004.

Pese a no existir un único modelo de reconocimiento gamético, el modelo más ampliamente aceptado es el de reconocimiento de glicanos unidos a ZP3 (Avella et al, 2013).

Este modelo indica que los espermatozoides se unen a los O-glicanos ligados a las serinas (Ser332 y Ser334) de la proteína ZP3 (Figura 3, panel izquierdo). Así, esta unión induciría la reacción acrosómica en el gameto masculino permitiendo la fecundación, tras la cual los glicanos de la ZP3 serían eliminados por una glicosidasa liberada por los gránulos corticales del oocito evitándose la unión de un nuevo espermatozoide y, por tanto, la polispermia. Sin embargo, posteriores estudios realizados el pasado 2010 por Gahlay y colaboradores indicaron que los residuos Ser332 y Ser334, aunque participan en el proceso, no juegan un papel limitante en la interacción espermatozoide-ovocito.

Recientemente, se ha reportado que, si ZP2 se mantiene intacta, los espermatozoides se unen a la ZP independientemente de la fecundación y exocitosis de los gránulos corticales (Rankin et al., 2003; Baibakov et al., 2007; Gahlay et al., 2010; Burkart et al., 2012).

Así, en la búsqueda de nuevos modelos de unión espermatozoide-ovocito se generaron diferentes líneas de ratones transgénicos que expresaban las glicoproteínas humanas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. Los resultados mostraron que los espermatozoides humanos fueron capaces de unirse a la ZP únicamente en presencia de ZP2 (Yauger et al, 2011; Baibakov et al., 2012). En estos oocitos, el espermatozoide humano penetraba la ZP y se acumulaba en el espacio perivitelino, siendo sin embargo, incapaz de fecundar a los ovocitos de ratón (Baibakov et al., 2012). Estos resultados dieron pie a un nuevo modelo de reconocimiento de gametos, el modelo de escisión de ZP2,

en el cual se propone que el ligando de los espermatozoides humanos a la ZP es un dominio N-terminal de ZP2. Así, tras la fecundación, ZP2 se escinde, evitando la unión de nuevos espermatozoides a la superficie de la ZP (Figura 3, panel derecho).

Si bien podríamos pensar que la funcionalidad de ambos modelos es contradictoria, existen posibles explicaciones que apuntan a la complementariedad (no exclusión) de ambos modelos. Una posibilidad es que ZP2 y ZP3 formen un heterodímero de forma que el espermatozoide de ratón en primer lugar se uniría a ZP3 mediante los glicanos y esta unión induciría la reacción acrosómica del gameto masculino. Solamente los espermatozoides acrosoma reaccionados se unirían a ZP2. Además, la correcta escisión de ZP2 es imprescindible para conseguir un bloqueo eficiente de la polispermia.

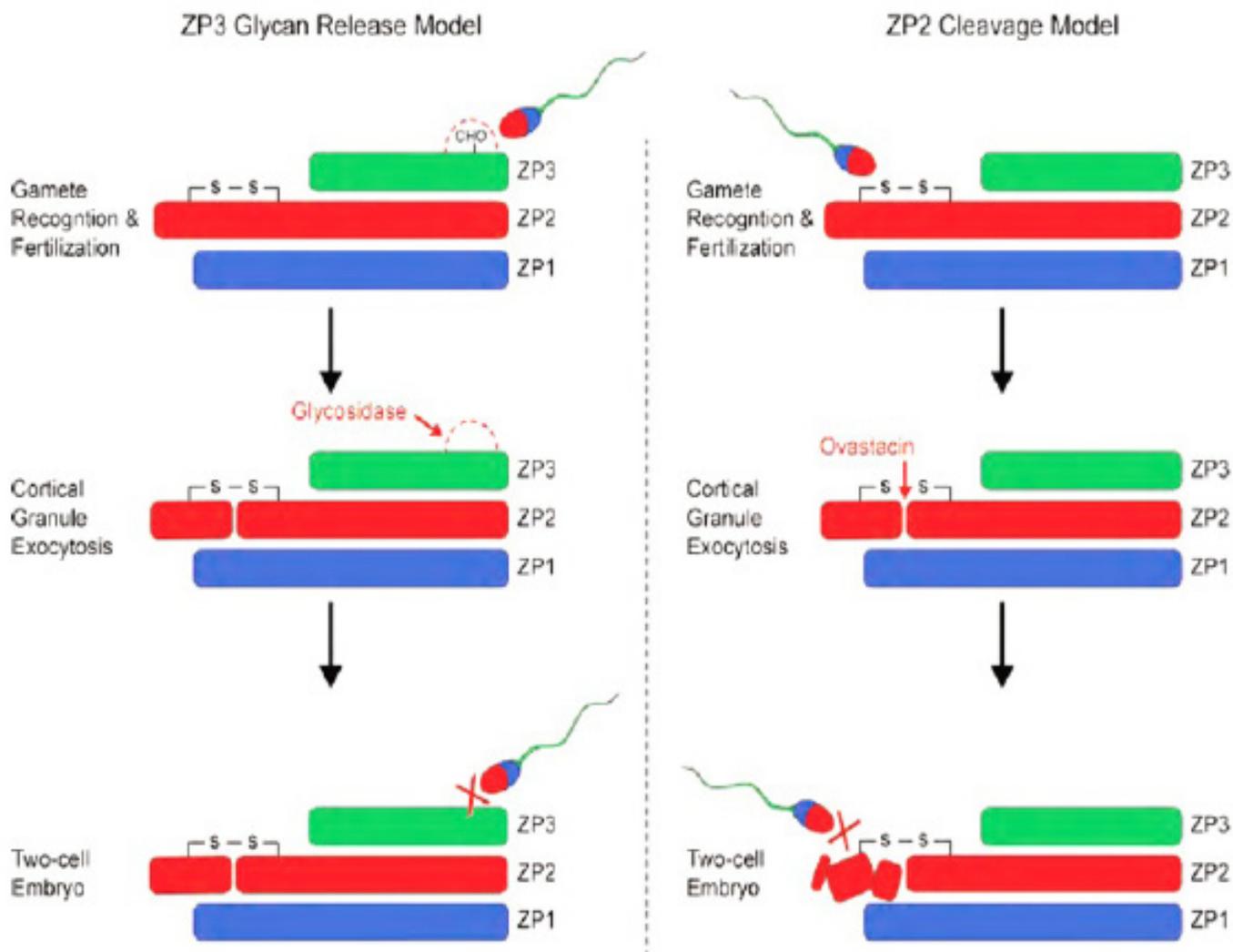


Figura 2. Modelos de reconocimiento de gametos. El modelo específico de liberación de glicanos (panel izquierdo) propone que los O-glicanos de Ser332 y Ser334 en ZP3 actúen como ligandos para un receptor de superficie de espermatozoide. Después de la fertilización, los gránulos corticales liberarían una glicosidasa que eliminaría los O-glicanos y explicaría la incapacidad de los espermatozoides de unirse a los embriones de 2 células. El modelo de escisión ZP2 (panel derecho) propone que los espermatozoides se unen a un dominio N-terminal de ZP2. Después de la fecundación, la ovastacina (codificada por Astl), liberada por los gránulos corticales, eliminaría por proteólisis el sitio de acoplamiento de ZP2 lo que impide que los espermatozoides se unan a los embriones de 2 células. Cada modelo ha sido probado usando la transgénesis del ratón. La zona pelúcida del ratón que contiene ZP3 humana en lugar de la de ratón no es compatible con la unión del espermatozoide humano y los ratones mutantes *Zp3S332A; S334A* tienen fertilidad normal. Estos resultados no son consistentes con el modelo ZP3 de liberación de glicanos, tal como se articula actualmente. Por el contrario, la zona pelúcida de ratón que contiene ZP2 humana en lugar de ratón soporta la unión / penetración de espermatozoide humano y los ratones *Zp2Mut* y *AstlNull* en los que ZP2 permanece sin escindir en embriones de 2 células apoyan la unión de espermatozoide de novo a pesar de la fecundación y exocitosis de gránulos corticales. Estos resultados apoyan el modelo de escisión ZP2 del reconocimiento de gametos (Gahlay et al., 2010; Baibakov et al., 2012; Burkart et al., 2012)

cronológico y, en gran medida, cronogenético. Así, concluyeron que la eficacia de la eclosión espontánea de los blastocistos humanos *in vivo* no está determinada por la calidad de la ZP y los gametos, sino por la calidad de los blastocistos en sí.

APLICACIONES

En el ovocito: inmunokontracepción

Como ya sabemos la ZP se encarga del reconocimiento gamético específico de especie y la inducción de la reacción

acrosómica. Así, la inmunización contra la ZP de las hembras conduce a un bloqueo de la fertilidad en varios modelos animales (Gupta et al., 1997), observándose, en la inmunización pasiva con anticuerpos contra las proteínas ZP, que los anticuerpos

séricos pueden pasar al fluido folicular y bloquear las interacciones entre los oocitos y las células de la granulosa (Skinner et al., 1996). Esto sugiere que los anticuerpos contra las proteínas ZP pueden interferir con el desarrollo folicular normal (Dunbar, 1990). Además, la inmunización activa con ciertos componentes de la ZP, que induce un bloqueo de la fertilidad que puede ser reversible o no (Jewgenow and Finkel, 1999), puede provocar una respuesta inmune que altere el desarrollo normal de los folículos ováricos (Prasad et al., 1996, 1997). Recientemente, se ha documentado que la inmunización activa con componentes de la ZP porcina (pZP) provocó una supresión profunda y temporal de la hormona antimülleriana (AMH) en las yeguas tratadas (Joone et al., 2018). Clínicamente, seis de siete yeguas tratadas con pZP demostraron un anestro intermitente persistente durante este tiempo, caracterizado por ovarios bilaterales pequeños, concentraciones de progesterona sérica basales y un recuento de folículos antrales bajo (Joone et al., 2017). La disminución de la AMH durante la inmunización con pZP puede deberse a una disminución del número de folículos antrales y/o a la regulación a la baja de la expresión de AMH por las células de la granulosa. Preferentemente, se sugiere que la supresión ovárica posterior a la vacunación pZP en la yegua se debe a una destrucción inmunitaria de los folículos en desarrollo, así como a una inhibición de la foliculogénesis debido a la interferencia de los anticuerpos en la comunicación de los oocitos con las células de la granulosa (Bechert et al., 2013).

Pero sigue siendo necesaria una mayor experimentación para determinar qué proteínas de la ZP no influyen de forma irreversible en el desarrollo folicular normal, pero provocan anticuerpos que interfieren con la unión gamética.

En el embrión: Polscope (herramienta clínica no invasiva) para predecir la implantación

Shen y colaboradores (2005) fueron los primeros en correlacionar la magnitud

de la retardancia de la ZP, en particular la de la capa interna, con la probabilidad de concepción.

El estudio se realizó en 166 oocitos seleccionados, según la puntuación pronuclear en día 1, para la transferencia después de ICSI (63 pacientes, $32'8 \pm 4'4$ años). Los datos se compararon entre dos grupos: oocitos de ciclos de concepción (CC; 65 oocitos / 23 pacientes) y oocitos de ciclos sin concepción (NCC; 101 oocitos / 40 pacientes) y siempre teniendo en cuenta la edad materna. Finalmente, concluyeron que la magnitud de la retardancia en la capa interna de la zona fue un 30% mayor ($p < 0'001$) en los oocitos del CC en comparación con el grupo NCC antes del ICSI. En concreto, si la magnitud de la retardancia de la capa interna de la ZP es superior a 3 nm es predictiva del grupo CC; mientras que la retardancia inferior a 2 nm parece estar asociada a un menor potencial de desarrollo y tasa de embarazo. Además, los oocitos del grupo CC presentaban una morfología de la ZP más homogénea en comparación con los oocitos del grupo NCC. Estos datos indican que los embriones de buena calidad provienen de oocitos que muestran una retardancia significativamente mayor en la capa más interna de la zona (Shen et al, 2005). En concreto, los oocitos que tienen una ZP cuya capa interna cuenta con un grosor aproximado de 10-12 μm exhiben la mejor progresión a blastocisto (Shen et al, 2005; Raju et al, 2007).

CONCLUSIONES

La ZP es una capa fundamental tanto para el gameto femenino como para el embrión preimplantacional hasta el estadio de blastocisto. Variaciones en la estructura de la misma puede influir en la consecución de sus funciones. Así, una correcta ZP implica un correcto desarrollo folicular y una completa maduración del oocito. La expresión de las proteínas de la zona puede contribuir al establecimiento de gradientes de polaridad y a mejorar la señalización entre los oocitos y las células somáticas mediante proyecciones transzonales. La acumulación de factores autocrinos y paracrinos en la zona podría potenciar

el desarrollo de oocitos/embriones. Una ZP gruesa y sólida también podría ser una ventaja en el ICSI, ya que protege particularmente bien al oocito del estrés mecánico durante el procedimiento de microinyección. Todo ello determina dos posibles aplicaciones que tienen gran interés en el campo de la reproducción asistida, convirtiendo a la ZP en una moneda de doble cara.

Por un lado, las propiedades de la ZP humana podrían estimar la calidad del oocito/embrión de una cohorte dada permitiendo, gracias a la tecnología del PolScope, seleccionar los de mejor calidad aumentando así las probabilidades de éxito del ciclo de forma inmediata y sin efectos adversos sobre los oocitos ni embriones (no invasivo). Asimismo, cobran gran interés las variaciones que se producen en la ZP en el desarrollo de oocitos a embriones ya que juega un papel esencial en el desarrollo preimplantacional y su mejor comprensión facilitaría el desarrollo de nuevos procedimientos que aumenten las tasas de implantación en las técnicas de reproducción humana asistida.

Por otro lado, se ha documentado una disminución de AMH durante la inmunización activa con ZP que puede deberse a una disminución del número de folículos antrales provocada por la interferencia de los anticuerpos anti-ZP en el desarrollo folicular normal convirtiendo a la ZP en un objetivo muy atractivo para la vacunación anticonceptiva. Sin embargo, siguen siendo necesarias nuevas investigaciones centradas en esclarecer las bases moleculares del reconocimiento de gametos que aporten terapias novedosas para mejorar el panorama de infertilidad actual y proporcionen métodos anticonceptivos basados en la inmunización contra la ZP, sin influir en el desarrollo folicular.

BIBLIOGRAFÍA

Adjaye J. Whole-genome approaches for large-scale gene identification and expression analysis in mammalian preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17(1-2): 37-45.

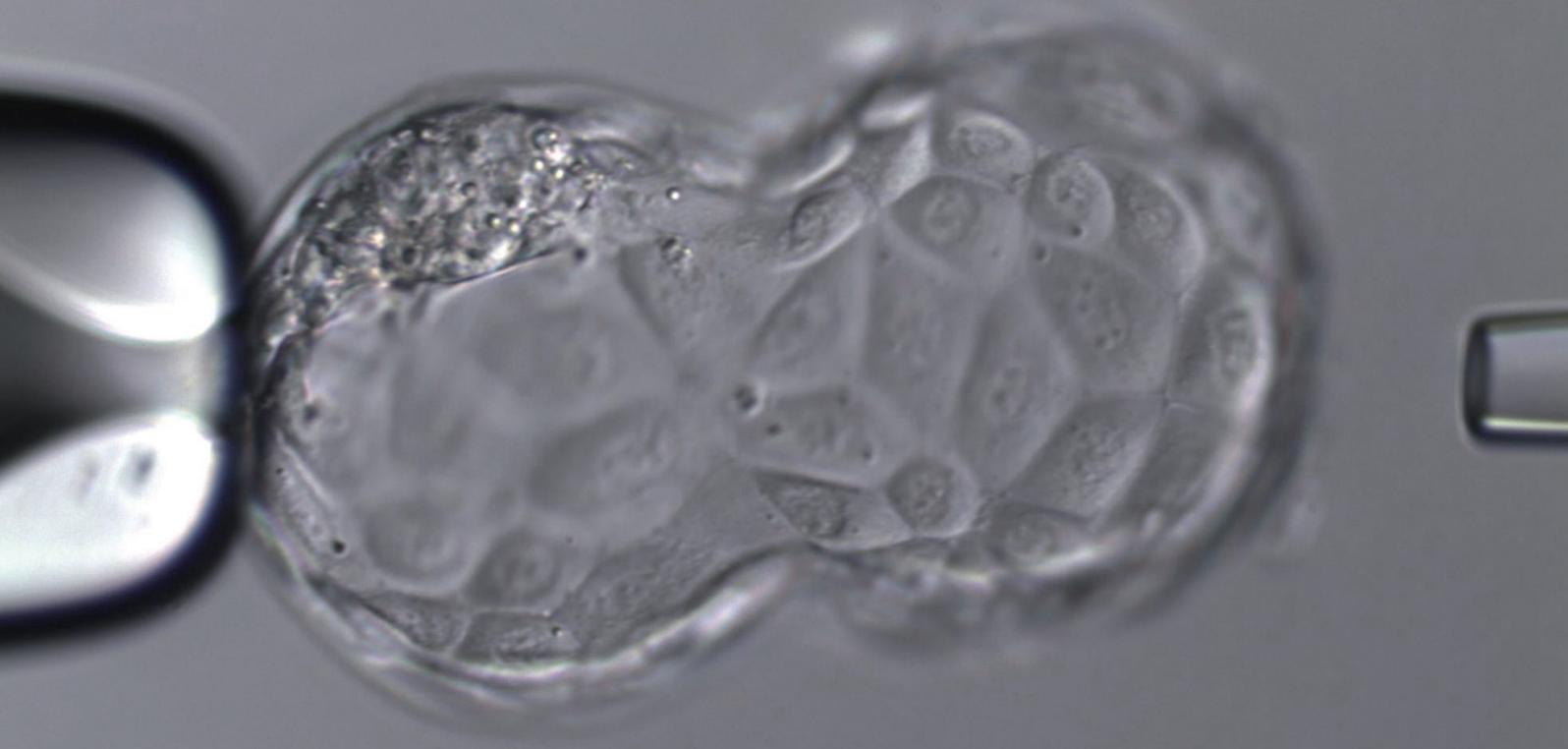
Avella MA, Xiong B, Dean J. The molecular

- basis of gamete recognition in mice and humans. *Molecular Human Reproduction*. 2013;19:279-89.
- Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 2007; 134:933-943.
- Baibakov B1, Boggs NA, Yauger B, Baibakov G, Dean J. Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *Journal of Cell Biology*. 2012;197:897-905.
- Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod* 2002;17:1239-43.
- Bechert U, Bartell J, Kutzler M, Menino A, Bildfell R, Anderson M, et al. Effects of two porcine zona pellucida immunocontraceptive vaccines on ovarian activity in horses. *J Wildl Manage* 2013;77:1386e400.
- Bronson, R.A., A. McLaren. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1970;22: 129-137.
- Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jimenez-Movilla M, Dean J. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Journal of Cell Biology* 2012;197:37-44.
- Bush, M.R., J.M. Mele, G.M. Couchman, D.K. Walmer. Evidence of juxtacrine signaling for transforming growth factor β in human endometrium. *Biol Reprod* 1998;59: 1522-1529.
- Cohen J. Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1991; 8:179-191.
- Das, S.K., X.-N. Wang, B.C. Paria, D. Damm, J.A. Abraham, M. Klagsbrun, G.K. Andrews, S.K. Dey. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: A possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 1994; 20: 1071-1083.
- Denker H. Structural Dynamics and Function of Early Embryonic Coats. *Cells Tissues Organs* 2000;166:180-207.
- Dunbar, B. S. Ovarian antigens and infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1990;21, 28-31.
- Familiari G, Relucanti M, Heyn R, Micara G, Correr. Threedimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc Res Tech* 2006;69:415-426.
- Fleming, T.P. Trophoctoderm biogenesis in the preimplantation mouse embryo; in Fleming T.P. (ed): *Epithelial Organization and Development*. London, Chapman & Hall, 1992;pp 111-136.
- Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* 2010;329:216- 219.
- Gonzales DS, Bavister BD. Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. *Biol Reprod* 1995; 52:470-480.
- Gupta S. Prospects of zona pellucida glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine. *Human Reproduction Update* 1997;3:311-324.
- Herrler, A., H.M. Beier. Early embryonic coats: Morphology, function, practical applications – An overview. *Cells Tissues Organs* 2000;166: 233-246.
- Herrler, A., F. Stewart, B. Crosset, J.M. Pell, P.D. Ellis, K.D. Brown, W.R. Allen, H.M. Beier. Proteins in the coats of preimplantation rabbit and horse embryos. *Zygote* 1998a; 6(suppl): 47-48.
- Herrler, A., F. Stewart, B. Crosset, J.M. Pell, P.D. Ellis, K.D. Brown, H.M. Beier, W.R. Allen. Embryonic coats – A mailbox in early embryo-maternal signalling (abstract). *J Reprod Fertil, Abstr*. 1998b;Series 21: 22.
- Jewgenow K, Fickel J. Sequential Expression of Zona Pellucida Protein Genes during the Oogenesis of Domestic Cats. *Biology of Reproduction* 1999;60:522-526.
- Johnson, M.H., J.C. Chisholm, T.P. Fleming, E. Houliston. A role for cytoplasmic determinants in the development of the early mouse embryo? *J Embryol Exp Morphol* 1986a;97(suppl):97-121.
- Johnson, M.H., B. Maro, M. Takeichi. The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J Embryol Exp Morphol* 1986b; 93: 239- 255.
- Johnson, M.H., H.P.M. Pratt, A.H. Handyside. The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo; in Glasser S.R., D.W. Bullock (eds): *Cellular and Molecular Aspects of Implantation*. New York, Plenum Press, 1981;pp 55-74.
- Joone CJ, Bertschinger HJ, Gupta SK, Fosgate GT, Arukha AP, Minhas V, Dieterman E, Schulman ML. Ovarian function and pregnancy outcome in pony mares following immunocontraception with native and recombinant porcine zona pellucida vaccines. *Equine Vet J* 2017;2: 189-195.
- Joone CJ, Schulman ML, Fosgate GT, Claes ANJ, Gupta SK, Botha AE, Human A, Bertschinger HJ. Serum anti-Mullerian hormone dynamics in mares following immunocontraception with anti-zona pellucida or -GnRH vaccines. *Theriogenology* 2018; 214-220.
- Karagouni, E.E., A. Chryssikopoulos, T. Mantzavinos, N. Kanakas, E.N. Dotsika. Interleukin-1 β and interleukin-1 may affect the implantation rate of patients undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;70:553-559.
- Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* 2004; 19:1580-1586.
- Lin S, Lee R, Tsai Y. *In Vivo* Hatching Phenomenon of Mouse Blastocysts During Implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2001;18:341-345.
- Modlinski, J.A. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs *in vivo*. *J Embryol Exp Morphol* 1970;23: 539-547.

- Montag M, Koll B, Holmes P, Ven H. Significance of the Number of Embryonic Cells and the State of the Zona Pellucida for Hatching of Mouse Blastocysts In Vitro Versus In Vivo. *Biology of Reproduction* 2000;62:1738-1744.
- Oldenbourg R. Polarized light microscopy of spindles. *Methods Cell Biol* 1999;61:175-208.
- Orsini MW, McLaren A. Loss of the zona pellucida in mice and the effect of tubal ligation and ovariectomy. *J Reprod Fertil* 1967; 13:485-499.
- Pelletier C, Keefe D, Trimarchi J. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertility and Sterility* 2004; 81:850-856.
- Perona R, Wassarman PM. Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoctoderm. *Dev Biol* 1986; 114:42-52.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline. *Fertil. Steril.* 102, 348-51.
- Prasad, S. V., B. Wilkins, and B. S. Dunbar, 1996: Molecular biology approaches to evaluate species variation in immunogenicity and antigenicity of zona pellucida proteins. *J. Reprod. Fert.* 1996; 50: 143-149.
- Prasad, S. V., S. M. Skinner, and B. S. Dunbar, 1997: Zona pellucida antigens and the regulation of fertility: an immun contraceptive approach. *New Horizons in Reproductive Medicine.* 1997; 129-144.
- Qi H, Williams Z, Wassarman PM. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell* 2002;13: 530-41.
- Raju G, Prakash G, Krishna K, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive BioMedicine Online* 2007;14:166-174.
- Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse 'sperm receptors' with human homologues. *Dev Cell* 2003; 5:33-43.
- Rosenfeld MG, Joshi MD. Effect of a rat uterine fluid endopeptidase on lysis of the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1981; 61:199-203.
- Shalgi, R., and T. Raz. The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histol. Histopathol* 1997;12: 813-822.
- Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod* 2005;20:1596-606.
- Silva CP, Silva V, Kommineni K, Keefe D. Effect of in vitro culture of mammalian embryos on the architecture of the zona pellucida. *Biol Bull* 1997;193:235-6.
- Sireesha GV, Mason RW, Hassanein M, Tonack S, Navarrete Santos A. Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster. *Mol Hum Reprod.* 2008; 14(6): 337-46.
- Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Kolle S and Palma G. Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol.* 2001; 30,257-263.
- Simón, C., A. Frances, G.N. Piquette, I. El Danasouri, G. Zurawski, W. Dang, M.L. Polan. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994;134: 521-528.
- Skinner, S. V., Prasad, T. M., and Ndolo, B. S. Dunbar, P. M., The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and development expression. *Reprod. Fert. Dev.* 1996; 4:59-76.
- Soyal SM, Amleh A and Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development.* 2000; 127,4645-4654.
- Syrkasheva A, Dolgushina N, Romanov A, Burmenskaya O, Makarova N, Ibragimova E, Kalinina E, Sukhikh G. Cell and genetic predictors of human blastocyst hatching success in assisted reproduction. *Zygote* 2017;25:631-636.
- Wassarman, P. M., and S. Mortillo, Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 130:85-110.
- Yauger B1, Boggs NA, Dean J. Human ZP4 is not sufficient for taxon-specific sperm recognition of the zona pellucida in transgenic mice. *Reproduction.* 2011;141(3):313-9.

OLYMPUS

Your Vision, Our Future



Solo con OLYMPUS lo verás así

Microscopio
invertido

IX73

Descubre un micromanipulador
flexible, ergonómico
y fácil de usar.



Más información en:
www.olympus4art.com

Imagen cedida por:
[embryotools](http://embryotools.com)

INFLUENCIA DE LOS GENES DE EFECTO MATERNO Y TRANSICIÓN MATERNO-CIGÓTICA

INFLUENCE OF MATERNAL EFFECT GENES AND MATERNAL-CIGOTIC TRANSITION

Tania Moreno e Ismael Henarejos
tania.moreno1994@gmail.com
ihc.europa@gmail.com

RESUMEN: La embriogénesis humana es un proceso que requiere de eventos bien orquestados y coordinados. Factores almacenados en el ovocito denominados genes de efecto materno (MEG, del inglés Maternally Expressed Genes) se expresarán tras la fecundación para el correcto desarrollo del embrión. Los MEG están involucrados en la remodelación de histonas, el control del huso mitótico, la formación del retículo endoplásmico (RE), la distribución de orgánulos, la activación de genes embrionarios y la impronta genómica, entre otros. En los últimos años, se han determinado varias proteínas codificadas por estos genes, las cuales son clave para la embriogénesis.

Tras una o varias rondas de escisión de blastómeros, el genoma del cigoto comienza a transcribirse y convirtiéndose en el responsable del desarrollo embrionario, mientras que los transcritos maternos se degradan gradualmente. Que esta transición materno-cigótica se lleve a cabo correctamente es una condición vital para la supervivencia del cigoto, pues problemas en este proceso pueden acarrear el bloqueo de los embriones y su degeneración. Sin embargo, son todavía desconocidos los genes implicados en este proceso, así como los marcadores de pluripotencia en el blastocisto y los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos.

En esta revisión se resumen los genes y transcritos implicados en la embriogénesis temprana y en la transición materno-cigótica. Estamos ante un campo de investigación que ha ganado interés en los últimos años debido a la búsqueda de biomarcadores que nos puedan dar información sobre la viabilidad y el potencial de desarrollo embrionario. Esto nos permitiría mejorar y modificar los tratamientos de reproducción asistida (TRA).

Palabras clave: efecto materno; desarrollo embrionario; transcriptoma; pluripotencia

ABSTRACT: Human embryogenesis is a process that requires well coordinated steps. Factors stored in the oocyte, so-called maternally expressed genes (MEG), will be translated after fertilization for the correct development of the embryo. The MEGs are involved in histone remodeling, mitotic spindle control, endoplasmic reticulum formation (ER), organelle distribution, embryonic gene activation and genomic imprinting, among others. In recent years, several proteins have been determined codified by these genes, which are key to embryogenesis.

After one or several rounds of blastomere cleavage, the zygote genome starts to be transcribed and becomes the one responsible for embryonic development, while maternal transcripts are gradually degrading. To carry out this maternal-zygotic transition correctly is a vital condition for the survival of the zygote, because problems in this process can lead to the blockage of the embryos and their degeneration. However, the genes involved in this process are still unknown, as well as the pluripotency markers in the blastocyst and the molecular mechanisms that underlie these processes.

In this review we summarize the genes and transcripts involved in early embryogenesis and in the maternal-zygotic transition. This research field has earned interest in recent years due to the search of biomarkers that can give us information about the feasibility and potential of embryonic development. This would allow us to improve and modify the assisted reproduction treatments (ART).

Keywords: Maternal factor; embryonic development, transcriptome; pluripotency

INTRODUCCIÓN

Durante el crecimiento del ovocito se van acumulando transcritos de los MEG cuya traducción se encuentra inhibida. Unos transcritos serán traducidos para

propiciar el bloqueo de la polispermia y otros serán transcritos tras la fecundación por el espermatozoide, ya que están implicados en diversos procesos a partir de este momento (Kim and Lee, 2014). Ambos genomas,

materno y paterno, son necesarios para el éxito del desarrollo. Sin embargo, los gametos tienen una carga desigual para garantizar el éxito en el desarrollo, desempeñando un papel de menor importancia en la fecundación

y en la embriogénesis temprana los componentes celulares almacenados en el espermatozoide (Bruce, 2013).

Experimentos con microarrays y análisis proteómicos han definido los patrones globales de expresión génica en el desarrollo temprano y proporcionan información sobre el papel de los genes específicos durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. Los estudios genéticos han demostrado que los MEGs afectan a múltiples procesos, incluyendo la formación pronuclear y la fusión (Philipps et al., 2008; Wu et al., 2003), la primera división celular (Burns et al., 2003; Tang et al., 2007), la transcripción de genes embrionarios (Bultman et al., 2006; Ramos et al., 2004) y la embriogénesis (Li et al., 2008a; Ma et al., 2006; Payer et al., 2003; Roest et al., 2004; Tong et al., 2000).

Durante las primeras divisiones embrionarias, los transcritos de origen materno irán desapareciendo gradualmente, comenzando así la transición materno-cigótica (ilustración 1). Este evento de degradación del 90% de los transcritos maternos, ocurre fundamentalmente en el estadio de 2 células en ratones, en el estadio de 4 células en humanos y en el estadio de 8 a 16 células en ganado (Bruce, 2013). El resultado de esta transición es la expresión de los genes del embrión. El pico de máxima expresión ocurre en la etapa de 8 células, lo cual señala la activación del genoma del cigoto (ZGA, del inglés *zygotic genome activation*).

La transición materno-cigótica es esencial para el desarrollo embrionario ya que coordina la división celular y la activación de genes del cigoto con el objetivo de preparar al embrión para la diferenciación celular y el posterior desarrollo, proveyendo de los sustratos moleculares necesarios para iniciar la gastrulación y especificación en determinadas capas y líneas celulares (endodermo, ectodermo y mesodermo) (Jukam et al., 2017).

En esta revisión expondremos en qué procesos a día de hoy se conoce la participación de los MEG, así como los últimos avances acerca de

los procesos relacionados con los perfiles de expresión génica durante el desarrollo embrionario humano preimplantacional, la transición materno-cigótica, la ZGA y las conclusiones que se pueden extraer de los transcriptomas de estas fases tempranas del desarrollo embrionario.

Durante el crecimiento de los ovocitos de ratón, el diámetro de estos aumenta de ~10 µm a 80 µm. El genoma materno se transcribe y estos transcritos se acumulan (~100 pg) hasta que los ovocitos alcanzan un diámetro de ~65 µm. La mayoría de los transcritos se traducen directamente en proteínas, muchas de las cuales han

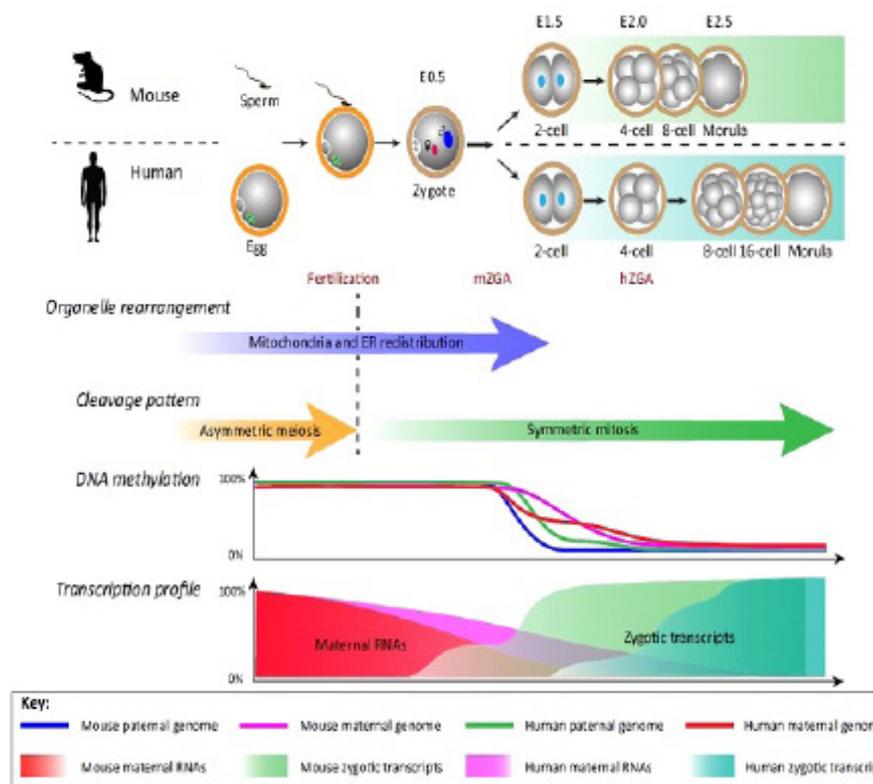


Ilustración 1. Transición del ovocito al embrión temprano en el ratón y en el ser humano. En los mamíferos, esta transición comienza con la fecundación del ovocito por parte del espermatozoide, lo que da inicio a una serie de cambios; a nivel celular se pasa de unas divisiones asimétricas propias de la meiosis a divisiones simétricas mitóticas; a nivel de orgánulos, se redistribuyen dinámicamente las mitocondrias y el retículo endoplasmático; a nivel molecular, los genomas de la madre y del embrión son desmetilados en patrones activos y pasivos; los transcritos de la madre son degradados gradualmente tras la fecundación mientras que el genoma del embrión es activado tras los primeros ciclos celulares. En el ratón, la activación genómica ocurre en la fase de dos células, mientras que en el humano esto ocurre en la transición de 4 a 6 células (Lu et al., 2017).

DISCUSIÓN

GENES Y TRANSCRITOS DEL OVOCITO

Tras la fecundación, los MEG se encargan del procesamiento del genoma masculino, cuya participación es necesaria para la embriogénesis. A continuación, eliminan los RNA y proteínas maternas y seguidamente activan el genoma embrionario, lo cual es esencial para el desarrollo embrionario más allá del tercer ciclo celular.

sido catalogadas. Sin embargo, otros transcritos permanecen en estado latente, y se activan más adelante en la ovogénesis mediante un proceso de poliadenilación.

A continuación, se describen los principales procesos desde la formación del embrión hasta su desarrollo a blastocisto en los que están implicados los MEG:

Bloqueo de la poliespermia

El bloqueo de la poliespermia es de vital importancia en la fecundación ya que la fecundación por más de un espermatozoide podría acarrear problemas de aneuploidías y fallos en el desarrollo embrionario. Uno de los genes implicadas es *Uchl1*, el cual, codifica para una proteína de fusión en la membrana ovocitaria (Kim and Lee, 2014).

Remodelación de histonas

La producción eficiente de histonas para el empaquetamiento del DNA recién replicado es particularmente importante para la división celular adecuada y el control epigenético durante las etapas iniciales en la implantación.

El factor nuclear de histona P (*Hinfp*) es el único factor de transcripción conocido para la expresión del gen de la histona H4, el cual se une directamente a un elemento específico del promotor de H4 para regular la transcripción. La delección de *Hinfp* en fibroblastos embrionarios genera inestabilidad genómica y compromete la viabilidad celular. Esto explicaría el espaciamiento, el estrés replicativo, la alteración en la síntesis de DNA y la aneuploidía (Ghule et al., 2014). Los mRNA de histonas no se pasan a las células hijas en la mitosis del embrión porque se degradan rápidamente al completar la fase S. Esta degradación selectiva de los mRNA de histona provoca que se requiera de una síntesis de novo durante cada ciclo de división. Por lo tanto, una pregunta clave es cuándo y cómo las células activan la expresión de *Hinfp* (Ghule et al., 2016). Mediante *knockout*, se observó que *Hinfp* produce transcritos activamente durante la ovogénesis y su expresión cigótica protege a los embriones de la deficiencia de histonas (Ghule et al., 2016).

Por otro lado, el gen *Brm*, cuya subunidad catalítica *Brg1* es un factor de supervivencia celular. Es esencial para la ZGA y está vinculado también a la modificación de histonas, en particular de la histona H3-K4 (Kim and

Lee, 2014). Otro factor transcripcional, *Ctcf*, se ha propuesto como candidato por su función MEG ya que su déficit afecta a la ZGA en etapas tempranas al reducir la metilación de la histona H19 y la disminución por tanto en la competencia del desarrollo embrionario (Kim and Lee, 2014).

El complejo materno subcortical (SCMC)

Se ha estudiado el papel de un complejo funcional de origen materno y almacenado en el ovocito de ratón, el SCMC, como posible modulador de varios de los procesos necesarios la transición materno-cigótica (Lu et al., 2017). Este complejo integra múltiples proteínas codificadas por los MEG y aparentemente su función se encuentra conservada en los mamíferos. Comprende *Mater*, *Pillia*, *Floped*, *Tle6*, *Zbed3*, *Nlrp2* y posiblemente *Padl6* (Tabla I). Se determinó que todas las proteínas que forman parte del complejo SCMC en el ratón presentan homólogos en el humano y se encuentran conservados para un gran porcentaje de sus dominios. Esto lleva a la idea de que la exploración de la función de SCMC en modelos de ratón podría conllevar a planteamientos terapéuticos para las causas de infertilidad humana y abortos espontáneos, además de la posibilidad de que un SCMC humana podría existir (hSCMC), pero son necesarios más estudios al respecto (Li et al., 2013, Lu et al., 2017).

Este complejo está asociado a muchas funciones en la transición de ovocito a embrión (Ilustración 2):

Controla la posición del huso por la regulación de actina del citoesqueleto: La transición de ovocito a embrión va acompañada del cambio de una meiosis asimétrica a una mitosis simétrica, posiblemente bajo el control de la F-actina. Se ha observado que la mala posición del huso está asociada a mutantes de *Tle6*, *Mater*, *Fliped* y *Zbed3* (Lu et al., 2017).

Regulan la formación del retículo endoplasmático (RE): El retículo endoplasmático se distribuye por todo el citoplasma de los ovocitos. Se ha

especulado que puede servir como almacenamiento de RNA y ribosomas maternos. Varios estudios recientes han demostrado que la función de éste está relacionada con SCMC puesto que *Floped*, *Mater* y *Padi6* residen en el RE (Lu et al., 2017).

Distribución de los orgánulos: Un estudio reveló que aquellos ovocitos donde no se expresa *Mater* exhibían un aumento de la actividad de sus mitocondrias, lo que condujo a un aumento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pudiendo afectar a muchos eventos de señalización como, por ejemplo, la redistribución de RE que conlleva una disminución de las reservas de Ca^{2+} intracelular, provocando una detención del desarrollo. Esto se observó posteriormente también en mutantes *Tle6*, *Padi6* y *Zbed3*. (Lu et al., 2017).

Linaje Celular: EL SCMC también ejercería un papel importante en el establecimiento del destino celular. Según lo observado en embriones de ratón, la disminución del contacto celular, junto con la exclusión de SCMC predice a la participación de este en el establecimiento del linaje celular. Aquellos embriones carentes de SCMC sólo eran capaces de convertir las células externas en ICM, mientras que las que sí lo contienen forman preferentemente el trofoectodermo. Que algunas células internas se conviertan en células del trofoectodermo podría reflejar la restauración del SCMC en ausencia del contacto célula a célula. La localización de *Cdx2* y *Floped* uniéndose a homopolímeros de ribonucleótidos son ideas firmes de que el complejo tiene un papel en el secuestro de RNA en las células externas para influir en vías posteriores para el linaje. Por lo tanto, este complejo podría participar en el mantenimiento de la pluripotencia de las blastómeras (Li et al., 2010).

Degradación de transcritos

La cantidad de mRNA disminuye en un 60% durante el primer ciclo celular y para la etapa de dos células, más del 90% del mRNA materno se ha degradado (Bachvarova, 1985; Paynton et al., 1988). Esta degradación gradual es



TRANSCRIPCIÓN MATERNO-CIGÓTICA

Ilustración 2. Efectos del SCMC en el ovocito y desarrollo embrionario (Lu et al., 2017)

debida a su desestabilización mediado por micro-RNA embrionario (Giraldez et al., 2006; Miccoli et al., 2017). Se postula la existencia de un conjunto de mecanismos para degradar de manera diferencial estos mRNA, entre los que destacan las secuencias 3'UTR, Atg5 y Ago2 (Kim and Lee, 2014). Existen dos vías de degradación: la materna y la cigótica, siendo esta última dependiente de los transcritos cigóticos y se activa 2h después de la fecundación.

Algunos de los transcritos susceptibles a la degradación son proteínas que desempeñan papeles importantes durante la meiosis y que son perjudiciales para el desarrollo tras la fecundación. Destacan los genes H100, c-mos, tPA y gdf9 cuyas transcripciones se degradan rápidamente tras la fecundación. Esto se corrobora mediante RT-PCR donde se observó que ninguno de estos transcritos se expresaba durante el desarrollo embrionario preimplantacional (Gráfica 1) (Alizadeh et al., 2005).

Activación del genoma del cigoto

La ZGA en el embrión humano es un proceso que se considera gradual, comenzando a detectarse transcritos en el embrión de dos células (Vassena et al., 2011) y aumentando el número de estos transcritos a medida que crece el número de células y núcleos (B. Liu and Grosshans, 2017). Este modelo de activación se denomina "en ondas" y a día de hoy se sigue estudiando qué genes

se expresan durante este proceso y cuál es su función (C. Liu et al., 2018, Miao et al., 2018). Pese a la importancia de este proceso, se desconocen exactamente los mecanismos moleculares que ocurren en esta fase del embrión humano.

Recientemente se ha realizado un estudio usando la técnica de edición genética CRISPR-Cas9 con el fin de sobreexpresar en mioblastos humanos la familia de genes DUX, la cual regula una gran cantidad de genes en la ZGA (De Iaco et al., 2017). La regulación génica que lleva a cabo la familia DUX ocurre cuando se unen a los promotores de los genes, resultando en un aumento de la transcripción. El estudio detectó mediante ARN-seq transcritos para estos factores de transcripción desde el ovocito hasta la fase de 4 células en el embrión. (De Iaco et al., 2017, Vassena et al., 2011). Los resultados del estudio sugieren que la familia DUX tendría un papel importante en actuar como factores pioneros del inicio de la transcripción del genoma del embrión humano, ya que permitirían el acceso de la maquinaria transcripcional a los sitios de inicio de la transcripción de estos genes (De Iaco et al., 2017)

Otro estudio destacable es el uso del CRISPR-Cas9 en embriones humanos para determinar el papel de OCT4/POU5F1 en la segmentación (Fogarty et al., 2017). OCT4 es uno de los marcadores de pluripotencialidad en el blastocisto, el cual si se silencia se observa que los embriones se bloquean

en la segmentación, en concreto en la transición de 4 a 8 células. Por tanto, OCT4 asumiría un papel importante y previamente no detectado en la ZGA humana, y defectos en su expresión podrían comprometer la calidad y viabilidad de los embriones humanos. (Fogarty et al., 2017).

GENES Y TRANSCRITOS DEL EMBRIÓN

Transcriptómica del desarrollo embrionario humano durante el desarrollo preimplantacional y establecimiento del destino celular.

De manera general, unos 200 genes aumentan su expresión en la fase de 2 células, siendo genes relacionados con la biosíntesis y modificación de proteínas, regulados por factores maternos. Principalmente, se traducen proteínas de unión a ácido nucleico, proteínas ribosómicas e histonas, sugiriendo que la primera ola de síntesis de proteínas va dirigida a la formación de la maquinaria transcripcional y traduccional para posteriores fases del desarrollo (Vassena et al., 2011).

Aproximadamente unos 250 genes diferentes a los de los estadios anteriores aumentan su expresión al inicio de la fase de 4 células y en este momento se activa una maquinaria transcripcional reguladora cigótica. Este proceso se mantiene y crece de manera gradual y estable en fases posteriores de 8 y 10 células, donde continúa la biosíntesis de proteínas y la actividad transcripcional, alcanzando un pico de expresión en la etapa de 8 células (Vassena et al., 2011). Este pico de expresión se pierde en la transición a la mórula, donde se favorece la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, aminoácidos, proteínas y carbohidratos, suceso que continúa en la transición a blastocisto (Vassena et al., 2011). Los perfiles de expresión génica en el blastocisto se han estudiado más detenidamente, especialmente por su relación con las células madre embrionarias (Fassnacht and Ciosk, 2017, Stirparo et al., 2018). Además, la transcriptómica del blastocisto nos permite estudiar cómo se establece la pluripotencialidad a nivel génico, y qué genes se relacionan

con la determinación del posible destino celular (ectodermo, mesodermo, endodermo) (D. V. Onichtchouk and Voronina, 2015).

El establecimiento de la pluripotencialidad de manera general se debe a la regulación de 3 factores de transcripción: NANOG, OCT4/POU5F1, y SOX2. Estos junto con el coactivador p300 regulan la expresión de genes uniéndose a potenciadores de la transcripción, en concreto, a secuencias específicas denominadas SOX-POU (D. V. Onichtchouk and Voronina, 2015) (Ilustración 3).

CONCLUSIÓN

La calidad del ovocito es un factor crítico que limita la eficacia de las TRA y el éxito del embarazo. Esto se debe a la participación de los factores maternos acumulados en el ovocito en diversos procesos del desarrollo embrionario temprano incluyendo bloqueo de la polispermia, remodelación de histonas, control del huso, formación del RE, distribución de orgánulo, activación de genes embrionarios, establecimiento de linaje y degradación de mRNA maternos. Sin embargo, a pesar de que diferentes estudios han demostrado la asociación entre perfiles de expresión génica y producción de embriones de calidad, la regulación de la calidad de los ovocitos sigue siendo poco conocida.

Comprender el transcriptoma del desarrollo embrionario humano es vital para interpretar los aspectos funcionales del genoma, sin embargo, las dificultades éticas y legales a la hora de realizar investigación con embriones humanos, han impedido que haya un gran número de estudios al respecto. Destacar que los estudios en ratones abren la posibilidad de nuevas aplicaciones en las TRA debido a la homología con los humanos.

AGRADECIMIENTOS

María José Escribá Pérez y Nuria Soler Balaguer por el apoyo y la ayuda en la redacción de este artículo.

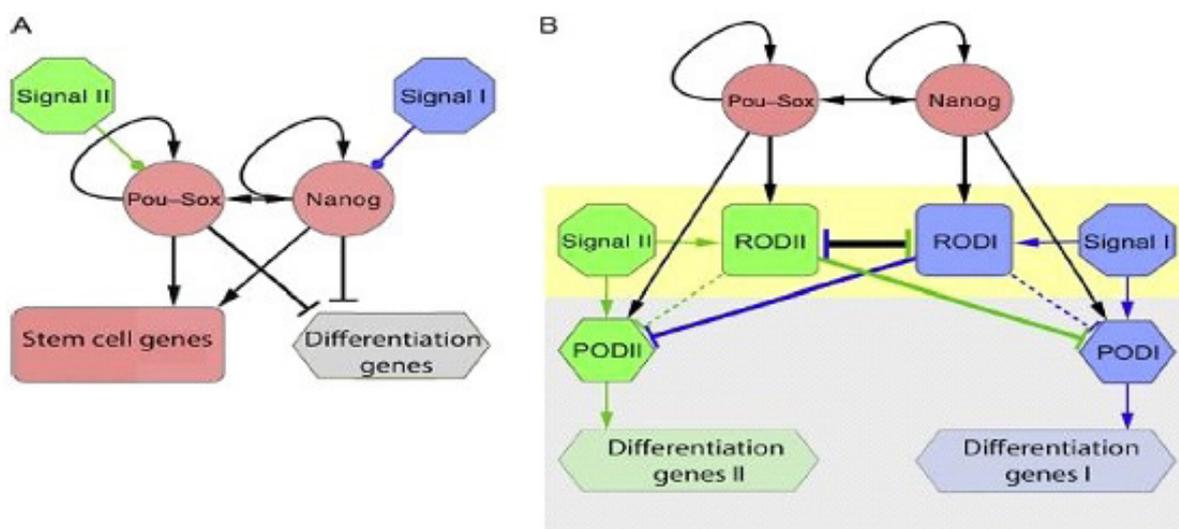
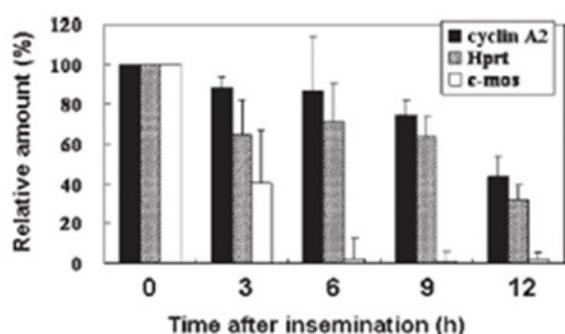


Ilustración 3. Dos modelos posibles del establecimiento de la pluripotencia y mantenimiento de ésta. Las flechas con punta indican que la expresión es favorecida, mientras que las flechas con punta redonda indican represión de la expresión. La terminación en línea representa inhibición. (A) Modelo simplificado: En respuesta a unas condiciones ambientales, los genes OCT4/POUFSI, SOX2 y NANOG son activados y bajo un mecanismo de feedback positivo mantienen su propia expresión, estableciendo el estado de pluripotencia, caracterizado por la expresión de genes propios de células madres, mientras que los genes de diferenciación se encuentran inhibidos hasta que una serie de señales impliquen la transición a un estado diferenciado. (B) Modelo de transición en el embrión en el blastocisto tardío y en la gastrulación. Bajo el efecto del circuito POU-SOX-NANOG, se encuentran activados una serie de factores de represión de la diferenciación, RODI y RODII. Previo a la diferenciación existe un equilibrio entre las señales de diferenciación y la expresión de los ROD. En respuesta a unas señales específicas de tejido, aumentan su expresión, el equilibrio se rompe y un ROD de una línea celular determinada continua activo, mientras que la otra se inhibe, permitiendo la expresión de unos promotores de la diferenciación POD que transcribirán los genes relacionados con una línea celular determinada (D. Onichtchouk and Driever, 2016; D. V. Onichtchouk and Voronina, 2015; M. Zhang et al., 2017)



Gráfica 1. Degradación de varios mRNA. Se seleccionaron C-mos, ciclina A2 y Hprt puesto que se expresan abundantemente en ovocitos. C-mos es una transcripción específica de ovocitos y no se detecta en embriones de una sola célula, mientras que las ciclinas A2 y Hprt se detectan en ambos, ovocitos y embriones tempranos y las cantidades de estas transcripciones no difieren notablemente en embriones de una y dos células (Alizadeh et al., 2005).

Gen	Símbolo en ratones	Símbolo en humanos	Manifestación clínica en mutantes	Funciones en las que se han visto asociados durante la transición ovocito-embrión
Mater	Nlrp5	NLR P5	Bloqueo del desarrollo en 2 células, reducción de la transcripción embrionaria, incremento de ROS, problemas en la distribución mitocondrial	Control de la posición del huso, regulación de la formación del RE y distribución de orgánulos
Filia	Khd3	KHD C3L	Inestabilidad, aneuploidia, reducción de las tasas de fecundación en ratón y del desarrollo preimplantacional	Actividad genómica
Floped	Ooep	OOE P	Bloqueo en etapa de 2 células, mala progresión del ciclo celular, asimetría	Control de la posición del huso, regulación de la formación del RE y actividad genómica
Tle6	Tle6	TLE 6	Asimetría, arresto en etapa de 2 células, mala distribución de orgánulos	Control de la posición del huso y distribución de orgánulos
Zbed3	Zbed3	ZBE D3	Asimetría, reducción de la fertilidad, mala distribución de orgánulos	Control de la posición del huso y distribución de orgánulos
Nlrp2	Nlrp2	NLR P2	Morfología anormal, subfertilidad	
Padi6	Padi6	PAD I6	Arresto en etapa de 2 células, problemas en ZGA, defectos en la redistribución de orgánulos	Regulación de la formación del RE y distribución de orgánulos

Tabla 1. Componentes del SCMC.

BIBLIOGRAFÍA

Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. Degradation of Maternal mRNA in Mouse Embryos: Selective Degradation of Specific mRNAs After Fertilization. 2005; 281-290.

Bruce AW. Generating different genetic expression patterns in the early embryo: Insights from the mouse model. 2013;6: 586-592.

Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. Genes Dev 2006;13: 1744-1754.

Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, et al. Roles of NPM2 in Chromatin and Nucleolar Organization in Oocytes and Embryos. Science 2003;5619: 633 LP-636.

Denomme MM, Mann MRW. Maternal control of genomic imprint maintenance. 2013;6: 629- 636.

De Iaco A, Planet E, Coluccio A, Verp S, Duc J, Trono D. DUX- family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals. Nat Genet 2017;49:941-945.

- Fassnacht C, Ciosk R. Cell Fate Maintenance and Reprogramming During the Oocyte-to-Embryo Transition. *Results Probl Cell Differ* 2017;59:269-286.
- Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, et al. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature* 2017;550:67-73.
- Ghule PN, Xie R-, Medina R, Colby JL, Jones SN, Lian JB, et al. Fidelity of histone gene regulation is obligatory for genome replication and stability. *Mol Cell Biol* 2014;14: 2650-2659.
- Ghule PN, Xie R, Colby JL, Rivera-pérez J,A., Jones SN, Lian JB, et al. Maternal expression and early induction of histone gene transcription factor Hinf1 sustains development in pre-implantation embryos. *Dev Biol* 2016;2: 311-320.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. *Science* 2006;5770: 75 LP-79.
- Jukam D, Shariati SAM, Skotheim JM. Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Dev Cell* 2017;42:316-332.
- Kim K, Lee K. Maternal effect genes: Findings and effects on mouse embryo development embryonic arrest. 2014;2: 47-61.
- Liu B, Grosshans J. Link of Zygotic Genome Activation and Cell Cycle Control. *Methods Mol Biol* 2017;1605:11-30.
- Liu C, Ma Y, Shang Y, Huo R, Li W. Post-translational regulation of the maternal-to-zygotic transition. *Cell Mol Life Sci* 2018;.
- Li L, Baibakov B, Dean J. A Subcortical Maternal Complex Essential for Pre-implantation Mouse Embryogenesis. 2008;3: 416-425.
- Li L, Lu X, Dean J. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol Aspects Med* 2013;5: 919- 938.
- Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. 2010;: 859-870.
- Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith A. A maternal-zygotic effect gene *Zfp57* maintains both maternal and paternal imprints. 2008;4: 547-557.
- Lu X, Gao Z, Qin D, Li L. A Maternal Functional Module in the Mammalian Oocyte-To-Embryo Transition. *Trends Mol Med* 2017;11: 1014-1023.
- Ma J, Zeng F, Schultz RM, Tseng H. Basonuclin: a novel mammalian maternal-effect gene. *Development* 2006;10: 2053 LP-2062.
- Miao YL, Gambini A, Zhang Y, Padilla-Banks E, Jefferson WN, Bernhardt ML, et al. Mediator complex component MED13 regulates zygotic genome activation and is required for postimplantation development in the mouse. *Biol Reprod* 2018;.
- Miccoli A, Dalla L, Carnevali O. The maternal control in the embryonic development of zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 2017;: 55-68.
- Onichtchouk D, Driever W. Zygotic Genome Activators, Developmental Timing, and Pluripotency. *Curr Top Dev Biol* 2016;116:273-297.
- Onichtchouk DV, Voronina AS. Regulation of Zygotic Genome and Cellular Pluripotency. *Biochemistry (Mosc)* 2015;80:1723- 1733.
- Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JPC, Zahn D, et al. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. 2003;23: 2110-2117.
- Paynton BV, Rempel R, Bachvarova R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 1988;2: 304-314.
- Philipps DL, Wigglesworth K, Hartford SA, Sun F, Pattabiraman S, Schimenti K, et al. The dual bromodomain and WD repeat-containing mouse protein BRWD1 is required for normal spermiogenesis and the oocyte-embryo transition. *Dev Biol* 2008;1: 72-82.
- Ramos SBV, Stumpo DJ, Kennington EA, Phillips RS, Bock CB, Ribeiro-Neto F, et al. The CCCH tandem zinc-finger protein *Zfp36l2* is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development* 2004;19: 4883 LP-4893.
- Schulz KN, Bondra ER, Moshe A, Villalta JE, Lieb JD, Kaplan T, et al. Zelda is differentially required for chromatin accessibility, transcription factor binding, and gene expression in the early *Drosophila* embryo. *Genome Res* 2015;25:1715-1726.
- Stirparo GG, Boroviak T, Guo G, Nichols J, Smith A, Bertone P. Integrated analysis of single-cell embryo data yields a unified transcriptome signature for the human pre-implantation epiblast. *Development* 2018;145:10.1242/dev.158501.
- Tang F, Kaneda M, O. Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007;6: 644-648.
- Tong ZB, G., and Nelson LM. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. 2000;: 267-269
- Vassena R, Boue S, Gonzalez-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 2011;138:3699-3709.
- Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (*Zar1*) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. 2003;: 187-191.

Técnicas de reproducción asistida de última generación

Productos y servicios específicos para cada paso del ciclo de fecundación in vitro

La familia de compañías CooperSurgical incluye líderes mundiales en FIV y genética reproductiva, proporcionando soluciones innovadoras para cada paso del ciclo de Reproducción Asistida.

Trabajando juntos, ofrecemos un amplio rango de consumibles y equipos de confianza, así como un conjunto completo de pruebas genéticas y servicios.

Al colaborar con expertos en el campo, abrimos las puertas a la excelencia científica y a una innovación constante, en línea con las técnicas más avanzadas y acorde a las necesidades del cliente. Le ofrecemos soluciones personalizadas, un elevado nivel de formación y talleres impartidos por expertos.

Visita nuestra web para obtener más información.



CooperSurgical Fertility Companies

ORIGIO a/s | informacion@origio.com | origio.com

CooperGenomicsSM
a CooperSurgical company

ReprogeneticsSM RecombineSM Genesis GeneticsSM

globalsupport@coopergenomics.com
coopergenomics.com

TRANSFERENCIA NUCLEAR, ÚLTIMA TECNOLOGÍA PARA PREVENIR LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

NUCLEAR TRANSFER, A NOVEL ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNIQUE TO AVOID MITOCHONDRIAL DISEASES

Autores: Aina Solé Garrigós, Núria Oliveras Cañellas, Luis Carmona Saborido, Adelaida Santana Martin, Vicente Guillén González, Javier Domingo del Pozo.

IVI Las Palmas. Avda. Juan Carlos I, 17, Edificio Corona, 35010 Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas.

Aina Solé Garrigós

Email: aina.sole91@gmail.com

RESUMEN: Las enfermedades mitocondriales se producen por la alteración en una o más proteínas localizadas en las mitocondrias e involucradas en el metabolismo celular. Estas enfermedades pueden estar causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) o por mutaciones en genes nucleares que codifican para proteínas implicadas en el correcto funcionamiento de la mitocondria.

Dada la gran complejidad y variedad de presentaciones clínicas no existe un tratamiento terapéutico definitivo. Por esta razón, se han propuesto técnicas de transferencia nuclear, con la idea de prevenir la transmisión del ADNmt mutado. Estas técnicas también se denominan de reemplazo mitocondrial y actualmente existen distintas metodologías: transferencia de vesícula germinal, de huso meiótico, pronuclear y de corpúsculo polar. Estas técnicas las veremos en detalle en esta revisión al igual que los resultados actuales en estudios clínicos en humanos.

Palabras clave: ADN mitocondrial, transferencia nuclear, enfermedad de ADN mitocondrial, reemplazo mitocondrial.

ABSTRACT: Mitochondrial diseases are caused by the alteration in one or more proteins located in the mitochondria and involved in cellular metabolism. These diseases can be caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or by mutations in nuclear genes that code for proteins involved in the proper functioning of the mitochondria. Diseases caused by the mutation in mtDNA, follow a pattern of maternal inheritance.

Due to the great complexity and variety of clinical symptoms, there isn't an effective therapeutic treatment. For this reason, nuclear transfer techniques have been proposed, with the aim of preventing the transmission of mutated mtDNA. These techniques are also called mitochondrial replacement and currently, there are different methodologies: germinal vesicle transfer, meiotic, pronuclear and polar corpuscle spindle. In this review we will see these techniques in detail, as well as the current results in clinical trials in humans.

Keywords: Mitochondrial DNA, nuclear transfer, mitochondrial DNA diseases, mitochondrial replacement.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades mitocondriales son causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) o en genes nucleares involucrados en funciones mitocondriales.

En un individuo sano, todas las copias del genoma mitocondrial de todas las células del individuo son idénticas, esto es lo que se denomina homoplasmia (Brown et al., 2006).

En un individuo enfermo, nos podemos encontrar con dos situaciones. Por una parte, todas las copias del genoma mitocondrial estén mutadas y hablaríamos de mutación homoplásmica. En el caso de una paciente con mutación homoplásmica, ésta transmitirá a toda su descendencia la enfermedad (Brown et al., 2006). Por otra parte, que exista una mezcla en su genoma de ADNmt mutado y ADNmt *wild type* (WT) y se denominará mutación heteroplásmica (Craven et

al., 2010; Amato et al., 2014). En este caso la paciente pasará una mezcla de mitocondrias sanas y enfermas a la descendencia y dependiendo de la proporción de sanas y enfermas, el recién nacido estará afecto o no de la enfermedad o parcialmente afecto (Palacios-González and Medina-Arellano, 2017).

Las manifestaciones clínicas de las enfermedades mitocondriales tienen como diana principal órganos y tejidos

con alto requerimiento energético (Tachibana et al., 2013). El grado de afectación depende de la mutación específica que ocurra (Kang et al., 2016) y del porcentaje de heteroplasma presente. Por lo tanto, la patogenia es proporcional a la ratio ADNmt mutado/WT (Hyslop et al., 2016) y sólo se observará enfermedad clínica en aquellos pacientes donde la carga de ADN mitocondrial mutada sea superior al 60% en los tejidos afectados (Craven et al., 2010).

Hasta la fecha, no existe tratamiento definitivo para estas enfermedades. Ante la falta de tratamientos y las limitaciones del diagnóstico prenatal y preimplantacional, se ha propuesto la transferencia nuclear como técnica para prevenir la transmisión del ADNmt mutado. De manera genérica, a estas técnicas se les denomina de reemplazo mitocondrial (MRT) (Poulton et al., 2009; Hellebrekers et al., 2012; Richardson et al., 2015; Craven et al., 2017).

Las MRT consisten en reemplazar el ADNmt mutado por ADNmt sano procedente de un ovocito o cigoto donado con el fin de obtener descendencia sana para esta patología. Esta técnica permite a una mujer afectada de enfermedad mitocondrial causada por ADNmt mutado tener descendencia sana sin perder la información genética nuclear (Rulli, 2016; Yabuuchi et al., 2012).

El objetivo de esta revisión es observar las diferentes técnicas de realización del trasplante nuclear aplicado a técnicas de FIV en el contexto de enfermedades genéticas, así como beneficios, limitaciones técnicas, últimos progresos y casos clínicos presentados en la literatura científica.

TÉCNICAS DE REEMPLAZO MITOCONDRIAL

En un primer momento, se pensó que la transferencia citoplasmática de un donante sano a un ovocito con ADNmt mutado podría subsanar una enfermedad mitocondrial. Se observó que lo único que se consigue es crear un ovocito heteroplásmico con ambos

haplotipos mitocondriales (Amato et al., 2014) diluyendo levemente el efecto del ADNmt mutado (Brown et al., 2006). Esta técnica se utilizó en técnicas de reproducción asistida a finales de la década de los 90 y fundamentalmente en EE. UU (Cohen et al., 1997; Cohen et al., 1998). Esta técnica dio lugar a más de 30 recién nacidos vivos. Sin embargo, después de que se descubriera que tres niños nacidos tenían trastornos del desarrollo (dos casos de síndrome de Turner y un caso de trastorno autista ligado al cromosoma X), la agencia para la administración de alimentos y medicamentos (FDA) de EEUU prohibió el uso de esta técnica hasta que un ensayo clínico pudiera demostrar su seguridad (Barritt et al., 2001; Brenner et al., 2000).

Nuevas técnicas de reemplazo mitocondrial han sido desarrolladas. Ejemplos de estas técnicas son la transferencia de vesícula germinal, de huso meiótico en estadio de maduración ovocitaria MII, transferencia pronuclear o de corpúsculo polar.

TRANSFERENCIA DE VESÍCULA GERMINAL

La transferencia de vesícula germinal consiste en transferir el ADN de un ovocito inmaduro de una paciente con el ADNmt mutado a un ovocito sano

enucleado, ambos en el estadio de vesícula germinal (Brown et al., 2006).

El procedimiento de esta técnica consiste en introducir la pipeta de enucleación a través de la zona pelúcida y se extrae el núcleo visible de la vesícula germinal junto con una pequeña porción de citoplasma, denominado *karyoplast* del ovocito de la paciente. A continuación, el *karyoplast* se inserta en un ovocito enucleado de una donante. Las membranas del ovocito donante y el *karyoplast* se unifican por electrofusión y se cultivan *in vitro* para que maduren y posteriormente proceder a la fecundación (Zhang et al., 1999).

Según los estudios publicados hasta la fecha, los ovocitos humanos resultados de esta fusión son capaces de completar la maduración meiótica de forma normal e incluso fecundarse normalmente después del ICSI (Takeuchi et al., 2001; Zhang et al., 1999). Además, el estudio de Takeuchi et al., 2001, indica que el trasplante de vesícula germinal en sí mismo no aumenta la incidencia de aneuploidías.

Todos los estudios cultivaron los ovocitos en estadio de vesícula germinal en un medio con citocalasina B, antes de la micromanipulación. La exposición a citocalasina B fue beneficiosa para realizar la enucleación, aunque se

Tabla I. Estudios publicados de transferencia de VG en ovocitos humanos

Estudio	No. VG receptoras	Ovocitos Reconstituidos	No. Ovocitos MII	Análisis genético CP
Zhang et al., 1999	47	12	7	4/5 N
Takeuchi et al., 2001	8	7	5	3/5 N
Tesarik et al., 2003	44	40	29	SD
Zhang and Liu, 2015	SD	25 ^h VG/ ^r C 18 ^r VG/ ^h C	25 8	5/9 N 0/9 N

Ovocitos quiméricos

CP=corpúsculo polar, VG=vesícula germinal

N=normal

SD=sin datos

h=humano, r=ratón, C=citoplasma

Tabla I. Estudios publicados de transferencia de VG en ovocitos humanos

h=humano, r=ratón, C= citoplasma,
CP= corpúsculo polar, VG = vesícula germinal
SD= sin datos
N=normal

desconoce su efecto citotóxico en el futuro desarrollo embrionario (Tesarik et al., 2003).

Hallazgos adicionales en ovocitos quiméricos a los que se transfirieron recíprocamente vesículas germinales entre ovocitos humanos y de ratón, sugirieron que, ambos podrían compartir moléculas citoplasmáticas similares, las cuales, controlan la maduración meiótica, la extrusión de corpúsculo polar, el ensamblaje del huso meiótico, el alineamiento y la segregación cromosómica (Zhang and Liu, 2015).

TRANSFERENCIA DE HUSO MEIÓTICO EN ESTADIO MII

Una técnica alternativa es la transferencia del huso meiótico, donde el ADNmt puede ser reemplazado eficientemente con esta técnica sin influir en la fecundación ni en el desarrollo embrionario posterior (Tachibana et al., 2009). La transferencia de huso meiótico consiste en transferir el material genético nuclear (huso meiótico y los cromosomas) de un ovocito MII con mutación en el ADNmt a otro ovocito MII previamente enucleado sano que será inseminado a continuación (Amato et al., 2014).

En los ovocitos maduros MII, las mitocondrias se distribuyen uniformemente por todo el citoplasma y el huso meiótico y los cromosomas no tienen mitocondrias en su interior.

Los dos primeros estudios representados en el cuadro anterior sobre MRT en ovocitos humanos, obtuvieron bajos niveles de heteroplasmia (por debajo del 1%) confirmando la capacidad de la técnica para prevenir la transmisión de mutaciones del ADNmt a la descendencia. Sin embargo, una proporción significativa de cigotos resultantes contenían un número anormal de pronúcleos. Esta anomalía fue atribuida a un fallo en la segregación cromosómica en proceso de la meiosis, producido por una activación ovocitaria prematura durante la manipulación (Tachibana et al., 2013). El estudio realizado por Paull y colaboradores identifican que en células madre embrionarias derivadas de los blastocistos obtenidos, el cariotipo, la expresión de marcadores de pluripotencia, los perfiles metabólicos y la expresión de genes eran normales en comparación con los controles (Paull et al., 2013).

Aunque en el estudio de (Khang et al., 2016), la muestra es pequeña, las tasas de fecundación de los ovocitos generados por la transferencia del huso meiótico fueron comparables a las de los controles. Los protocolos modificados redujeron la tasa de activación anormal de ovocitos y alrededor del 75% de los cigotos se desarrollaron hasta la etapa de blastocito. Las tasas de aneuploidías y la calidad de los blastocistos fueron similares en comparación con los controles.

Con esta técnica, el equipo de Zhang, publicó el nacimiento de un niño sano de una mujer portadora de una

enfermedad mitocondrial con una carga de mtDNA materna menor al 10% (Zhang et al., 2017).

TRANSFERENCIA PRONUCLEAR

La transferencia Pronuclear (PNT) consiste en transferir los pronúcleos de un cigoto con ADNmt mutado al espacio perivitelino de otro cigoto donado previamente enucleado (Amato et al., 2014).

Después de la fecundación se extraen los pronúcleos, para ello, se penetra en la zona pelúcida con la pipeta de enucleación y se aspiran los pronúcleos junto con una pequeña porción del citoplasma conformando un *karyoplast* pronuclear. A continuación, se aspira el virus Sendai inactivado que actuará como agente que facilitará la fusión de membranas con el cigoto receptor. Por último, se inyecta la suspensión de virus junto con el *karyoplast* pronuclear en el espacio perivitelino de un cigoto enucleado receptor. Finalmente se incuba para facilitar la fusión de membranas (McGrath et al., 1983). El nuevo cigoto reconstituido contiene el núcleo con el ADN nuclear del cigoto del paciente y el citoplasma junto con el ADNmt del cigoto sano (Amato et al., 2014).

Craven et al., 2010, demostró que la transferencia de pronúcleos era compatible con el desarrollo *in vitro* de embriones humanos hasta el estadio de blastocisto. Para estudiar la viabilidad de la técnica, transfirió uno o dos pronúcleos entre cigotos anormalmente fecundados (unipronucleares y tripronucleares). En este caso la tasa de llegada a blastocisto fue del 8,3% y se debió fundamentalmente a la dotación cromosómicamente anormal de estos cigotos que limitó su potencial de desarrollo. La optimización del procedimiento minimizó significativamente el arrastre de ADNmt mutado con valores menores al 2%.

El equipo de Zhang en 2016, realizó una transferencia de pronúcleos en una pareja con repetidos bloqueos en el desarrollo embrionario. La paciente gestó en 3 ocasiones con resultado de un aborto espontáneo. Se analizaron los

Tabla II. Estudios publicados sobre transferencia de huso meiótico en ovocitos humanos

Estudio	n	Ovocitos Reconstituidos	Fecundación/Activación	Blastocistos
Tachibana et al., 2013	64	60	21	13
Paull et al., 2013	62	18	Partenogenotas	7
Kang et al., 2016	SD	6	4	1
Zhang et al., 2017	9	5	4	4

SD=sin datos

Tabla II. Estudios publicados sobre transferencia de huso meiótico en ovocitos humanos

Tabla III. Estudios publicados de PNT en cigotos humanos

Estudio	n	Cigotos reconstituidos	Blastocistos	Análisis genético	%ADNmt
<i>Craven et al., 2010</i>	44	10 (transferencia de 1PN) 8 (transferencia de 2PN)	2	SD	SD
	36		3	SD	<2%
<i>Zhang et al., 2016</i>	12	7	5	SD	0%
<i>Hyslop et al., 2016</i>	131	78	62	15/30 N	2-5%

PN=pronúcleos

SD=sin datos

N=normal

Tabla III. Estudios publicados de PNT en cigotos humanos

N=normal

PN=pronúcleos

SD=sin datos

cariotipos de los tejidos embrionarios de los restos fetales y fueron normales cromosómicamente. Además, el perfil del ADNmt fetal indicaba que procedían de la donante sin signos del ADNmt de los pacientes. Por lo tanto, validaron que la transferencia pronuclear se había realizado con éxito.

Hyslop et al., 2016, publicaron un nuevo protocolo de transferencia pronuclear que incluía el trasplante de pronúcleos 8 horas después de la finalización del ICSI. Los autores demostraron que realizar esta técnica en este período de tiempo mejoraba la viabilidad de los embriones reconstituidos. El arrastre de ADNmt mutado en los blastocistos fue menor al 5%. La calidad de los blastocistos reconstituidos y los perfiles de expresión fueron comparables con los controles.

TRANSFERENCIA CORPÚSCULO POLAR (PBNT)

El procedimiento se inicia con la recuperación del primer CP de un ovocito MII no fecundado de la paciente, seguido de una fusión con el citoplasma ovocitario enucleado de la donante. Los ovocitos MII reconstituidos se fecundan y transfieren a una receptora.

El segundo CP se recupera de cigotos en estadio pronuclear y se fusionan con cigotos receptores en los que se les ha eliminado los pronúcleos femeninos.

Los estudios previos en ratones

demostraron la viabilidad de usar la transferencia de los corpúsculos polares como una herramienta clínica ya que ambos contienen poca cantidad de ADN mitocondrial (Wang et al., 2014; Wakayama et al., 1997,1998). El grupo de Ma et al., 2017 describen la transferencia a través del primer corpúsculo polar (PB1). Mientras que un 76% de los ovocitos fecundaron correctamente y fueron capaces de finalizar la segunda meiosis de forma normal, solamente un 42% de cigotos alcanzaron el desarrollo hasta blastocisto. Pero a pesar de una caída en la tasa de desarrollo embrionario, los análisis genéticos, epigenéticos y transcriptómicos de células madre embrionarias derivadas de los blastocistos indicaron una marcada similitud con los controles.

Tabla IV. Estudios publicados de PBNT en ovocitos humanos

Estudio	n	PBNT	Fecundación	Meiosis II a término	Blastocistos	Análisis genético
<i>Ma et al., 2017</i>	SD	32	25/31	19/25	8	2 N
<i>Zhang et al., 2017</i>	28	22 (PB1T)	13	SD	4	2N
	26	17 (PB2T)	SD	SD	0	SD

SD=sin datos

N=normal

PB1T=transferencia del primer CP

PB2T=transferencia del segundo CP

Tabla IV. Estudios publicados de PBNT en ovocitos humanos

PB1T= Transferencia del primer CP

PB2T= Transferencia del segundo CP

N=Normal

SD= Sin datos

Los resultados del artículo de Zhang et al., 2017 revelaron que la transferencia del 1r CP, pero no la transferencia del 2n CP, podría generar con éxito cigotos normalmente fecundados con una alta eficiencia en el desarrollo a blastocistos.

DISCUSIÓN

La transmisión de enfermedades mitocondriales, puede prevenirse mediante varios enfoques, de los cuales, cada uno de ellos presenta ventajas, desventajas, limitaciones técnicas y éticas asociadas. El trasplante del genoma nuclear puede realizarse una vez el ovocito es fecundado, o antes de este proceso de manera que, el proceso de la meiosis femenina ofrece varias opciones.

El trasplante de vesícula germinal presenta la ventaja que el núcleo en este estadio es grande y visible al microscopio. Sin embargo, esto requeriría la maduración *in vitro* de los ovocitos desde la etapa de vesícula germinal hasta la etapa MII, paso limitante para el éxito de la técnica. Además, los ovocitos inmaduros son más sensibles a su manipulación, posiblemente debido a la distribución de los microfilamentos en la región cortical y perinuclear, hecho que hace necesario el empleo de disruptores de microfilamentos para la enucleación.

Actualmente, la estrategia más prometedora es transferir el genoma nuclear a partir del huso meiótico que por el contrario a la transferencia de vesícula germinal o de pronúcleos, los cromosomas de los ovocitos MII no están rodeados por una membrana nuclear. Es por eso, que es necesario el uso de tinciones de ADN y de tecnologías de luz UV o luz polarizada para visualizar los cromosomas. Pero su uso no es deseable, ya que puede ocurrir una activación prematura del ovocito. Y, además, sería difícil eliminar la posibilidad de que algunos cromosomas no se alineen correctamente en la placa metafásica, tal y como se ha observado en ovocitos de mujeres en edad materna avanzada. A pesar de las desventajas técnicas, se ha reportado un recién nacido vivo con el mínimo arrastre de ADNmt.

La transferencia pronuclear requiere de la fecundación tanto de los ovocitos proporcionados por la paciente portadora de la enfermedad como de la donante, y por lo tanto su uso plantea complejas implicaciones éticas. Además, el procedimiento supone el tratamiento de los cigotos con fármacos inhibidores de componentes del citoesqueleto, para facilitar la extracción del núcleo.

Los genes en este estadio se encuentran empaquetados en pronúcleos grandes claramente visibles, lo cual representa una ventaja para su extracción. También, la optimización de los procedimientos de enucleación y cultivo de embriones ha facilitado el desarrollo de blastocistos de buena calidad y con el mínimo arrastre de ADNmt.

El uso de los corpúsculos polares podría usarse como fuente de ADN nuclear con un mínimo arrastre de ADN mitocondrial. El 1^o CP tiene fácil visualización y manipulación. Asimismo, no genera heteroplasma en la descendencia y se lleva a cabo a nivel de ovocitos no fecundados. Para la transferencia del 2^o CP, se lleva a cabo una vez el ovocito es fecundado, pero el principal inconveniente es que el 2^o CP sólo tiene un haplotipo. Ambos nos permiten reducir el número de ovocitos requeridos de mujeres afectadas por mutaciones de mtDNA.

Las estrategias, propuestas anteriormente, han demostrado ser eficientes tanto en modelos animales, como en humanos. Pero su aplicación en la clínica aún sigue siendo un desafío. Similar a la donación de ovocitos, requieren la disponibilidad de suficientes donantes de ovocitos o cigotos, lo que podría ser un obstáculo para su aplicación. Cada vez hay más evidencias que sugieren que el uso de estas innovadoras tecnologías debe adoptarse con precaución y únicamente en pacientes altamente seleccionados. Y parece preferible restringirla en situaciones en el que el diagnóstico preimplantacional no pueda seleccionar embriones libres de estas anomalías genéticas.

A día de hoy son necesarios nuevos estudios de seguridad y eficacia que supervisen el uso de estas nuevas y prometedoras tecnologías que podrían evitar la transmisión de una enfermedad a la descendencia, manteniendo los genes maternos.

BIBLIOGRAFÍA

Amato P, Tachibana M, Sparman M, et al. Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases. *Fertil Steril* 2014;101(1):31-5.

Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, Cohen J. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic. *Human Reproduction* 2001;16(3):513-6

Brenner CA, Barritt JA, Willadsen S et al. Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril* 2000; 74(3):573-8.

Brown DT, et al. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. *Lancet* 2006; 368(9529):87-9.

Cohen J, Scott R, Alikani M, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes, *Mol. Hum. Reprod* 1998;4(3):269-80.

Cohen J, Scott R, Schimmel T, et al. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997;350(9072):186-7.

Craven L, Tang MX, Gorman GS, De Sutter P, Heindryckx B. Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease. *Hum Reprod Update* 2017;23(5):501-519.

Craven, L., Tuppen, H.A., Greggains, G.D., et al. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 2010; 465(7294):82-5.

Hellebrekers DM, Wolfe R, Hendrickx AT, de Coo IF, de Die CE, Geraedts JP, Chinnery PF, Smeets HJ. PGD and heteroplasmic mitochondrial DNA point mutations: a systematic review estimating the chance of healthy offspring. *Hum Reprod Update* 2012;18(4):341-9.

Hyslop, L.A., Blakeley, P., Craven, L., et al. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature* 2016; 534(7607):383-6.

Kang, E., Wu, J., Gutierrez, N.M., Koski, A., et al. Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Nature* 2016; 540(7632):270-275.

Ma H, O'Neil RC, Marti Gutierrez N et al. Functional Human Oocytes Generated by Transfer of Polar Body Genomes. *Cell Stem Cell* 2017; 20(1):112-119

McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 1983; 220(4603):1300-2.

Palacios-González, C., & Medina-Arellano, M. D. J. Mitochondrial replacement techniques and Mexico's rule of law: on the legality of the first maternal spindle transfer case. *Journal of Law and the Biosciences*, 2017; 4(1):50-69.

Paull D, Emmanuele V, Weiss KA, et al. Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature* 2013; 493(7434):632-7.

Poulton J, Kennedy S, Oakshott P, et al. Preventing transmission of maternally inherited mitochondrial DNA diseases. *BMJ* 2009; 338:b94.

Richardson J, Irving L, Hyslop LA., et al. Concise reviews: Assisted reproductive

technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Stem Cells* 2015;33(3):639-45.

Rulli T. What is the value of three-parent IVF? *Hast Cent Rep* 2016;46(4):38-47.

Tachibana, M., Sparman, M., Sritanaudomchai, H., et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 2009; 461(7262):367-72.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., et al. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 2013; 493(7434):627-31.

Takeuchi T, Gong J, Veeck LL, Rosenwaks Z, Palermo GD. Preliminary findings in germinal vesicle transplantation of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2001;16(4):730-6.

Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Mendoza C, Greco E. Microfilament disruption is required for enucleation and nuclear transfer in

germinal vesicle but not metaphase II human oocytes. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 1:677-81.

Wakayama T, Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol Reprod* 1998; 59(1):100-4.

Wakayama T, et al. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *J Reprod Fertil* 1997; 110(2):263-6.

Wang T, Sha H, Ji D, et al. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell* 2014; 157(7):1591-604.

Yabuuchi, A., Beyhan, Z., Kagawa, N., et al. Prevention of mitochondrial disease inheritance by assisted reproductive technologies: prospects and challenges. *Biochim. Biophys* 2012; 1820(5):637-42.

Zhang, JK., Wang, C. W., Krey, L., et al. In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle

transfer. *Fertil. Steril* 1999; 71(4):726-31.

Zhang, J., Liu, H. Cytoplasm replacement following germinal vesicle transfer restores meiotic maturation and spindle assembly in meiotically arrested oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2015; 31(1):71-8.

Zhang, J., Zhuang, G., Zeng, Y., et al. Pregnancy derived from human zygote pronuclear transfer in a patient who had arrested embryos following in vitro fertilization. *Reprod. Biomed. Online* 2016; 33(4):529-533.

Zhang J, Liu H, Luo S, et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod BioMed Online* 2017;34(4):361-8.

Zhang SP, Lu CF, Gong F et al. Polar body transfer restores the developmental potential of oocytes to blastocyst stage in a case of repeated embryo fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 2017;34(5):563-571.

epServices
for premium performance



Su éxito. Nuestro Compromiso.

Planes de mantenimiento, certificaciones y calibraciones para sus equipos de manipulación celular

Nuestro personal, altamente cualificado y certificado, comparte con usted el afán de éxito en reproducción y aplicaciones de cultivo celular. Conocemos los equipos, las aplicaciones y los protocolos de servicio que se deben llevar a cabo en cada momento. Garantice con nosotros la precisión de sus instrumentos y unos resultados reproducibles de forma duradera.

Para equipos Eppendorf:

- > Reparaciones
- > Actualizaciones
- > Planes de mantenimiento
- > Certificaciones IQ/OQ
- > Calibraciones
- > Asesoramiento técnico



Para otros equipos de su laboratorio:

- > Calibraciones ISO 17025*

www.eppendorf.com/epServices

Eppendorf - Servicio de Atención Técnica: Tel.: 91 651 76 94 · E-mail: sat@eppendorf.es

*Servicio realizado por proveedores acreditados. Para más información, contacte con nosotros.

Eppendorf®, The Eppendorf Brand Design and the epServices logo are registered trademarks of Eppendorf AG, Hamburg, Germany. All rights reserved, including graphics and images. Copyright © 2018 by Eppendorf AG.

GRUPO DE INTERÉS EN EMBRIOLOGÍA: MORFOLOGÍA EMBRIONARIA Y CORRELACIÓN CON ANEUPLOIDÍAS

Delgado A.¹, Pons MC.², Rives N.³, Carrasco B.², Cuadros M.⁴, Cuevas I.⁵, Teruel J.⁶, Cabello Y.⁷, Muñoz J.⁸, Hurtado de Mendoza M.V.⁹

¹Institut Universitari IVI València. Valencia. ²Institut Universitari Dexeus. Barcelona. ³Barcelona IVF. Barcelona. ⁴Madrid.

⁵Hospital General Universitario. Valencia. ⁶Equipo Juana Crespo. Valencia. ⁷Hospital Ruber Juan Bravo Quirón Salud. Madrid.

⁸Clínica Tambre. Madrid. ⁹Sevilla.

RESUMEN: La herramienta principal en el laboratorio para la selección embrionaria previa a la transferencia, es la observación de la morfología tradicional. Sin embargo, muchos de los embriones seleccionados pueden ser portadores de aneuploidías, influyendo en el resultado final del ciclo, bien con fallos de implantación o con pérdidas gestacionales. Por ello, muchos autores han tratado de establecer una relación entre la morfología embrionaria y la carga cromosómica del embrión en distintos estadios.

Palabras clave: euploidía, morfología, aneuploidía, blastocisto.

ABSTRACT: The main tool in the laboratory for embryonic selection prior to embryo transfer, is the observation of traditional morphology. However, many of the selected embryos can be carriers of aneuploidies, influencing the final result of the cycle, leading to implantation failures or pregnancy loss. Therefore, many authors have tried to establish a correlation between the embryonic morphology and the chromosomal charge of the embryo in different stages.

Keywords: euploidy, morphology, aneuploidy, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

El uso de la estimulación ovárica controlada en los tratamientos de reproducción asistida tiene como finalidad, en la mayoría de los ciclos, la obtención de múltiples ovocitos maduros, por lo que el número de embriones disponibles para transferir suele ser elevado.

Muchos embriones morfológicamente óptimos que son transferidos al útero, no logran implantar o generan gestaciones que finalizan en abortos espontáneos. Algunos de estos fracasos, pueden ser explicados por la presencia de anomalías cromosómicas en los embriones seleccionados para la transferencia.

Sin embargo, alguno de los aspectos más importantes de la viabilidad embrionaria, como la carga cromosómica, son indetectables mediante la observación morfológica clásica.

La estrategia más común, en la mayoría de los laboratorios de fecundación *in vitro* (FIV), para identificar los embriones viables capaces de dar lugar a una gestación evolutiva, está basada en criterios morfológicos tales como el número de células y la simetría de las mismas, la presencia de multinucleación, el porcentaje de fragmentación y la velocidad de desarrollo. En cuanto al estadio de blastocisto, nos centramos en la clasificación de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TF), así como en el grado de expansión.

Más recientemente, la tecnología *time lapse* ha entrado a formar parte de un gran número de laboratorios, aportando datos de la morfocinética embrionaria que vienen a complementar a la morfología tradicional.

A lo largo de estos últimos años, algunos autores han intentado establecer una correlación entre determinados parámetros morfológicos y la carga cromosómica final del embrión en distintos estadios del desarrollo embrionario, como día 3 y día 5 (Munné et al., 2006) (Magli et al., 2007) (Delgado A., 2015). Además, se han publicado distintos algoritmos de predicción de aneuploidías basados en la morfocinética embrionaria (Campbell et al., 2013) (Basile et al., 2014).

PATRÓN PRONUCLEAR

La primera valoración morfológica del embrión a estudiar es el patrón pronuclear del cigoto. Si tomamos como referencia el modelo de Scott (Scott, 2003), no parece relevante a la hora de determinar la dotación cromosómica del embrión, si bien el tipo I parece tener más probabilidad de euploidía al compararlo con el resto de patrones pronucleares (Gamiz et al., 2003) (Edirisinghe et al., 2005).

Además, hay autores que han correlacionado los parámetros espermáticos con el *score* pronuclear observado tras la microinyección espermática y la dotación cromosómica de los embriones resultantes (Kahraman et al., 2002), existiendo diferencias en cuanto a pronóstico de euploidía y tasa de blastulación entre los grupos I y II, siendo mejor el tipo I. Igualmente, se obtenían más embriones del grupo II cuando se utilizaba en la microinyección espermática muestra procedente de tejido testicular, incluyendo espermátidas redondas. También el grupo de Gianaroli (Gianaroli et al., 2006) encontró correlación entre determinados patrones pronucleares y la posibilidad de euploidía.

MORFOLOGÍA EN DÍA 3

Las aneuploidías son el principal factor genético que afecta al éxito de los ciclos de fecundación *in vitro*. La morfología embrionaria en día 3 de desarrollo, y su correlación con aneuploidías, han sido objeto de numerosos estudios (Márquez et al., 2000) (Munné et al., 2006) (Magli et al., 2007). Otros autores, además de evaluar la relación entre la morfología en día 3 con las aneuploidías, lo han hecho con la tasa de llegada a blastocisto (Eaton et al., 2009).

En cuanto a la morfología embrionaria en día 2 y día 3 de desarrollo, a mayor número de células respecto al desarrollo esperado, menor es la posibilidad de euploidía (Hardarson et al., 2001) (Munné, 2006) Por lo tanto, la velocidad de desarrollo sí que condiciona la euploidía del embrión (Magli et al., 2007). En este artículo se observó que los embriones de desarrollo lento,

aquellos que se bloqueaban y los que tenían una velocidad de desarrollo que podía considerarse rápida, tenían incrementadas las anomalías cromosómicas.

Por el contrario, un estudio reciente (Pons et al., 2018) observó que el 64.4% de los embriones en 8 células en día 3 y el 59.3% de los embriones considerados como rápidos en días 3 (>8 células), alcanzaban el estado de blastocisto. Tras el análisis genético de estos embriones, el 22.7% de los embriones en 8 células en día 3 y el 20.6% de los embriones rápidos, fueron diagnosticados como euploides. El análisis estadístico mostró que la probabilidad de un embrión rápido en día 3 de formar un blastocito euploide no era significativamente diferente a uno que procediera de 8 células.

Si nos fijamos en un grupo concreto de edad, algunos autores como Moayeri (Moayeri et al., 2008), sí que encuentran de utilidad la morfología en día 3 para predicción de euploidía en pacientes de edad materna avanzada, pero no para el grupo de pacientes jóvenes cuyos dismorfismos embrionarios pueden tener otro origen. En cuanto a la fragmentación, sí que puede ser un factor común a ambos grupos a tener en cuenta de cara a seleccionar un embrión euploide. En el caso del estudio del grupo de Eaton (Eaton et al., 2009), la morfología en día 3 no es concluyente como único parámetro para descartar embriones aneuploides, indicando por lo tanto, en pacientes concretas, el test genético preimplantacional.

Centrándonos en la fragmentación embrionaria, parece claro que el porcentaje de fragmentación sí que afecta a la dotación cromosómica final. En algunos casos, se han obtenido datos respecto al mosaicismo y otras alteraciones (poliploidías y haploidías) y aneuploidías (Munné, 2006). Según Munné, a medida que aumenta la fragmentación, se incrementa el porcentaje de embriones afectados por mosaicismo y otras alteraciones (poliploidías y haploidías) disminuyendo el número de embriones euploides disponibles. Respecto a las aneuploidías no es así, y no aumentan

proporcionalmente con el aumento de la fragmentación ya que éstas, están más ligadas a la edad avanzada (Munné et al., 2007). En referencia al tipo de fragmentación, sí que hay estudios que han hablado de obtener una mayor posibilidad de aneuploidía referida al tipo 4 (Magli et al., 2007).

Respecto a la simetría embrionaria, existen publicaciones que han obtenido tasas de anomalías cromosómicas elevadas en embriones con divisiones asimétricas (Hardarson et al., 2001). Se ha sugerido que esta asimetría podría causar multinucleación en los blastómeros resultantes y provocar un aumento de las aneuploidías en estos embriones. También los datos de Magli confirman la influencia de la simetría durante el desarrollo embrionario con un mayor porcentaje de aneuploidías en los embriones asimétricos (Magli et al., 2007).

Referente a la multinucleación, parece que a mayor número de células multinucleadas, menor es la posibilidad de euploidía. Hace casi 20 años, Kligman (Kligman et al., 1996) ya había encontrado cierta relación entre los embriones que presentaban multinucleación y los que no, respecto a su carga cromosómica. En su estudio, el porcentaje de embriones aneuploides aumentaba en aquellos embriones con células multinucleadas, aunque no se encontró una relación clara entre el día de la aparición de la multinucleación, el tipo, el número de células multinucleadas, la calidad embrionaria y la técnica empleada para inseminar los ovocitos (microinyección espermática o fecundación *in vitro* convencional), respecto al ratio de embriones anormales. Otros autores como Hardarson (Hardarson et al., 2001), también han relacionado la asimetría en las divisiones embrionarias con el grado de multinucleación y por lo tanto con una menor posibilidad de euploidía.

ESTADIO DE BLASTOCISTO

El cultivo, hasta el estadio de blastocisto, se ha implementado en la actualidad en muchas clínicas de fecundación *in vitro*, debido a que los

embriones que alcanzan este estadio tienen mayor potencial de implantación.

Sin embargo, la capacidad del cultivo largo hasta blastocisto de descartar los embriones aneuploides sigue siendo limitada. Los blastocistos, al igual que los embriones, continúan siendo portadores de anomalías cromosómicas, aunque la frecuencia de las mismas y la incidencia del mosaicismo son inferiores a la de los embriones en día 3 de desarrollo. Este dato es corroborado por autores como Sandalinas (Sandalinas et al., 2001), que encontró que los embriones portadores de trisomías puras alcanzaban el estadio de blastocisto en un 37%, y que algunas monosomías como la X y la 21 también eran capaces de hacerlo. Por otro lado, Rubio (Rubio et al., 2007), en su estudio, observó que los embriones euploides llegaban a blastocisto en un 68,2%, pero sin embargo, también los embriones aneuploides son capaces de alcanzar este estadio como en el caso de las trisomías y las monosomías.

Respecto a la morfología de los blastocistos, una proporción considerable de ellos, cromosómicamente anormales, alcanzan el máximo *score* y de la misma manera, algunos con peor *score* son euploides (Alfarawati et al., 2011). Más de la mitad de los blastocistos testados en ese estudio habían sido catalogados como anormales.

El efecto de la edad materna avanzada también estaba asociado al aumento de aneuploidías siendo del 51% en pacientes jóvenes respecto a las de edad materna avanzada donde se incrementaban hasta un 61%. El efecto de la edad materna y de la morfología del blastocisto, así como su posibilidad de euploidía, también ha sido estudiado por otros autores (Fragouli et al., 2013) (Fragouli et al., 2014) corroborando muchos de los datos adelantados por Alfarawati (Alfarawati et al., 2011). Parece claro que la edad materna afecta directamente al porcentaje de embriones aneuploides, así como también que algunos de estos embriones, como aquellos que tienen la trisomía 21, alcanzan el estadio de blastocisto y un alto *score*, siendo

indistinguibles de los blastocistos euploides (Fragouli et al., 2014).

Además, en ese mismo estudio y de manera específica, el *score* de la MCI y del TE, condicionaban la posibilidad de euploidía del blastocisto, siendo los *scores* más altos los que menos anomalías cromosómicas conllevaban. Este dato concuerda con los de otros estudios (Delgado, A. 2017), donde los blastocistos de mejor categoría según la clasificación de ASEBIR, mostraban índices más altos de euploidía. Además, el porcentaje de euploides también se veía influenciado por el día de llegada a blastocisto, siendo mayor en día 5 de desarrollo.

De esta manera, Capalbo (Capalbo et al., 2014) también obtuvo mayor posibilidad de euploidía entre los blastocistos que alcanzaban mayor *score*. Además, en el citado estudio, se correlacionó de manera negativa la tasa de llegada a blastocisto (respecto al día) con la edad de la paciente, siendo mayor a menor edad. Sin embargo, el porcentaje de euploides no difería mucho entre los que llegaban a blastocisto en día 5 o en día 6 de desarrollo.

TECNOLOGÍA TIME LAPSE

Entre los primeros estudios que han tratado de relacionar la morfocinética con las aneuploidías aparece el de Chavez (Chavez et al., 2012), que evaluó embriones en estadio de cuatro células llegando a la conclusión de que el ciclo inicial de los embriones euploides es más estable que el de los aneuploides.

En el 2013, Campbell y sus colaboradores (Campbell et al., 2013), evaluaron un grupo de blastocistos y la posibilidad que tenían de presentar anomalías simples o múltiples. Llegaron a la conclusión de que los embriones aneuploides presentan un retraso en la compactación, periblastulación y en el tiempo de llegada a blastocisto. Kramer (Kramer et al., 2014) aplicó este modelo en su laboratorio, pero los resultados no fueron reproducibles.

Autores como Chawla (Chawla et al., 2015), encontraron diferencias en los distintos parámetros morfocinéticos

al evaluar el desarrollo en embriones biopsiados en día 3, siendo más cercanos a los esperados en el caso de los euploides respecto a los aneuploides. Igualmente, Basile y su grupo también observaron diferencias morfocinéticas entre los embriones euploides y aneuploides, y propusieron un algoritmo que agrupaba a los embriones en cuatro categorías según su probabilidad de euploidía. (Basile et al., 2014).

Otros autores como Rienzi (Rienzi et al., 2015), con el uso de la tecnología *time lapse* y los *arrays* de hibridación genómica comparada, no encontraron diferencias significativas en cuanto a la morfocinética de los embriones euploides y aneuploides respecto al inicio de la compactación, de la blastulación y la blastulación completa dentro de un grupo de pacientes de mal pronóstico reproductivo.

Minasi (Minasi et al., 2016), observó que los blastocistos euploides presentaban mayor porcentaje de MCI y TF con *score* alto, además de mayor grado de expansión, y menor tiempo de formación de blastocisto, tiempo de expansión y eclosión más tempranos que en blastocistos aneuploides.

Recientemente, Nogales (Nogales et al., 2017), encontró diferencias morfocinéticas en los embriones aneuploides en función del tipo de aneuploidía, simple o compleja.

CONCLUSIÓN

La observación estática convencional de la morfología embrionaria, además del uso del *time lapse*, son herramientas de mejora de los resultados del laboratorio de fecundación *in vitro*, pero en la actualidad, con los datos que disponemos, no pueden sustituir de manera individual o conjunta al test genético preimplantacional para determinar la carga cromosómica de un embrión.

BIBLIOGRAFÍA

Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Stevens, J., Gutierrez-Mateo, C., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G. & Wells, D. 2011b,

"The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender", *Fertility and sterility*, vol. 95, no. 2, pp. 520-524.

Basile, N., Nogales Mdel, C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., Garcia-Velasco, J. & Meseguer, M. 2014, "Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis", *Fertility and sterility*, vol. 101, no. 3, pp. 699-704.

Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M. & Hickman, C.F.L. 2013a, "Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics", *Reproductive biomedicine online*, vol. 26, no. 5, pp. 477-485.

Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M. & Thornton, S. 2013b, "Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS", *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 27, no. 2, pp. 140-146.

Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., Nagy, Z.P. & Ubaldi, F.M. 2014, "Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts", *Human Reproduction*, vol. 29, no. 6, pp. 1173-1181.

Chavez, S.L., Loewke, K.E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., Behr, B. & Pera, R.A.R. 2012, "Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage", *Nature communications*, vol. 3, pp. 1251.

Chawla, M., Fakhri, M., Shunnar, A., Bayram, A., Hellani, A., Perumal, V., Divakaran, J. & Budak, E. 2015, "Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 32, no. 1, pp. 69-75.

Delgado, M.A.D. 2015, Relación entre los parámetros morfológicos, de gameto a blastocisto, con las anomalías cromosómicas y el éxito reproductivo. <http://eprints.ucm.es/38367/1/T37494.pdf>

Delgado, A. Parámetros embrionarios que afectan a la tasa de aneuploidías de los blastocistos humanos. IX Congreso ASEBIR; 2017 Nov15-17; Madrid, España.

Eaton, J.L., Hacker, M.R., Harris, D., Thornton, K.L. & Penzias, A.S. 2009, "Assessment of day-3 morphology and euploidy for individual chromosomes in embryos that develop to the blastocyst stage", *Fertility and sterility*, vol. 91, no. 6, pp. 2432-2436.

Edirisinghe, W., Jemmott, R., Smith, C. & Allan, J. 2005, "Association of pronuclear Z score with rates of aneuploidy in in vitro-fertilised embryos", *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 17, no. 5, pp. 529-534.

Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., Jaroudi, S., Sarasa, J., Enciso, M. & Wells, D. 2013b, "The origin and impact of embryonic aneuploidy", *Human genetics*, vol. 132, no. 9, pp. 1001-1013.

Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K. & Wells, D. 2014a, "Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos", *Molecular human reproduction*, vol. 20, no. 2, pp. 117-126.

Gamiz, P., Rubio, C., de los Santos, M.J., Mercader, A., Simon, C., Remohi, J. & Pellicer, A. 2003, "The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 18, no. 11, pp. 2413-2419.

Gianaroli, L., Magli, M., Ferraretti, A., Lappi, M., Borghi, E. & Ermini, B. 2006, "Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement", *Human reproduction*, vol. 22, no. 1, pp. 241-249.

Hardarson, T., Hanson, C., Sjogren, A. & Lundin, K. 2001, "Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 16, no. 2, pp. 313-318.

Kahraman, S., Kumtepe, Y., Sertyel, S.,

Donmez, E., Benkhalifa, M., Findikli, N. & Vanderzwalmen, P. 2002, "Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 17, no. 12, pp. 3193-3200.

Kligman, I., Benadiva, C., Alikani, M. & Munne, S. 1996, "The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities", *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 11, no. 7, pp. 1492-1498.

Kramer, Y.G., Kofinas, J.D., Melzer, K., Noyes, N., McCaffrey, C., Buldo-Licciardi, J., McCulloh, D.H. & Grifo, J.A. 2014, "Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal?", *Journal of assisted reproduction and genetics*, vol. 31, no. 9, pp. 1231-1242.

Magli, M.C., Gianaroli, L., Ferraretti, A.P., Lappi, M., Ruberti, A. & Farfalli, V. 2007, "Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement", *Fertility and sterility*, vol. 87, no. 3, pp. 534-541.

Márquez, C., Sandalinas, M., Bahçe, M. & Munné, S. 2000, "Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos", *Reproductive biomedicine online*, vol. 1, no. 1, pp. 17-26.

Minasi, M.G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M.T. & Greco, E. 2016, "Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study", *Human Reproduction*, vol. 31, no. 10, pp. 2245-2254.

Moayeri, S.E., Allen, R.B., Brewster, W.R., Kim, M.H., Porto, M. & Werlin, L.B. 2008, "Day-3 embryo morphology predicts euploidy among older subjects", *Fertility and sterility*, vol. 89, no. 1, pp. 118-123.

Munné, S. 2006a, "Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos", *Reproductive biomedicine online*, vol. 12, no. 2, pp. 234-253.

Munné, S., Chen, S., Colls, P., Garrisi, J., Zheng, X., Cekleniak, N., Lenzi, M., Hughes, P., Fischer, J. & Garrisi, M. 2007, "Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos", *Reproductive biomedicine online*, vol. 14, no. 5, pp. 628-634.

Nogales, M.D.C., Bronet, F., Basile, N., Martínez, E.M., Liñán, A., Rodrigo, L. & Meseguer, M. 2017a, "Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics", *Fertility and sterility*, vol. 107, no. 1, pp. 229-235. e2.

Pons, M.C., Carrasco, B., Parriego, M., Coroleu, B., Barri, P., Boada, M. & Veiga, A. 2018, "Deconstructing the myth of poor

prognosis for fast-cleaving embryos on Day 3. Is it time to change the consensus? "Human Reproduction (2018) 33 (suppl_1): i103

Rienzi, L., Capalbo, A., Stoppa, M., Romano, S., Maggiulli, R., Albricci, L., Scarica, C., Farcomeni, A., Vajta, G. & Ubaldi, F.M. 2015, "No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study", *Reproductive biomedicine online*, vol. 30, no. 1, pp. 57-66.

Rubio, C., Rodrigo, L., Mercader, A., Mateu, E., Buendía, P., Pehlivan, T., Vilorio, T., De los Santos, Ma José, Simón, C. & Remohí, J. 2007, "Impact of chromosomal

abnormalities on preimplantation embryo development", *Prenatal diagnosis*, vol. 27, no. 8, pp. 748-756.

Sandalinas, M., Sadowy, S., Alikani, M., Calderon, G., Cohen, J. & Munné, S. 2001, "Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage", *Human Reproduction*, vol. 16, no. 9, pp. 1954-1958.

Scott, L. 2003, "Pronuclear scoring as a predictor of embryo development", *Reproductive biomedicine online*, vol. 6, no. 2, pp. 201-214.

TESISVITA Solución eHealth para Medicina Reproductiva

Tratamientos Bancos

Agendas Facturación

Historial clínico

Estadísticas

- Intuitivo
- Seguro
- Flexible
- Interoperable
- Escalable

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

EXTERNAL QUALITY CONTROL IN ASSISTED HUMAN REPRODUCTION LABORATORY

Luis Martínez-Granados¹, Ana Clavero¹, María Carmen Gonzalvo¹, María Serrano², María Luisa López-Regalado¹, Antonio González-Utor³, Nereyda Ortíz⁴, Vicente Badajoz⁵, Jose Antonio Castilla^{1,6,7}

1 Unidad de reproducción. UGC laboratorio clínico, UGC Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Instituto de investigación biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Granada, 2 Clínica IFEM, Córdoba, 3 Clínica MasVida reproducción, Sevilla, 4 Instituto Europeo de Fertilidad, Madrid, 5 Ginefiv, Madrid, 6, CEIFER Biobanco, Granada, 7 Dpt. Anatomía y embriología humana. Facultad de Medicina. Universidad de Granada, Granada.

RESUMEN: El laboratorio de reproducción humana asistida debe estar orientado a satisfacer las necesidades de sus usuarios mediante procesos de probada seguridad y eficiencia. Para ello es clave la implantación de sistemas de calidad y programas de control de calidad internos (CCInt) y control de calidad externos (CCEExt).

Concretamente, los CCEExt permiten conocer la exactitud en los procedimientos controlados, aumentar la eficiencia de estos y conocer la variabilidad en los procesos llevados a cabo por los distintos laboratorios, además de ser la base de la transferibilidad de resultados entre laboratorios.

Hoy en día, existen 3 procedimientos con programas de CCEExt consolidados para el laboratorio de reproducción (análisis de semen, evaluación embrionaria y citotoxicidad). En estos programas, diferentes laboratorios analizan alícuotas de una misma muestra (tipo I).

En el futuro, sería conveniente la generalización de los programas existentes a más centros y el desarrollo e implantación de estos programas de CCEExt en otros procedimientos que se llevan a cabo en el laboratorio de reproducción.

ABSTRACT: The assisted human reproduction laboratory must be guided to the needs of its patients through proven safety and efficiency processes. The implementation of quality systems and internal (IQC) and external quality control (EQC) programs is key for this.

Specifically, the EQC programs allows to know accuracy in the controlled procedures, increase the procedures efficiency and to know variability in the procedures carried out by different laboratories, in addition to form the basis of the transferability of results between laboratories.

Today, there are 3 procedures with consolidated EQC programs for the reproduction laboratory (semen analysis, embryo assessment and cytotoxicity). In these programs, different laboratories analyze aliquots of the same sample (type I).

In the future, the existing EQC programmes should be generalized to more centers. The development and implementation of these EQC programs to other procedures that are carried out in the laboratory of reproduction is necessary.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

La variabilidad analítica es un fenómeno propio de los procesos de medida, que ocasiona que los resultados obtenidos al medir repetidamente una magnitud en un mismo espécimen puedan ser ligeramente diferentes entre sí (Haeckel, 1993). Este concepto, aplicado al manejo de gametos o al cultivo embrionario en el laboratorio de reproducción humana asistida (LRHA), es el que hace que

los resultados obtenidos al analizar, procesar o criopreservar alícuotas de un mismo espécimen sean ligeramente diferentes entre sí. Todo esto nos obliga a realizar un conjunto de acciones internas o externas conocido como "control de la calidad". Estas acciones deben estar planificadas, realizarse sistemáticamente y ser demostrables.

Los programas de control de calidad externos (CCEExt) más conocidos

en los laboratorios clínicos son los basados en la participación de diversos laboratorios que miden, con los mismos o diferentes procedimientos de medida, una o más magnitudes en los mismos materiales de control, y en el que los resultados obtenidos por un laboratorio son comparados con los resultados obtenidos por el resto de los laboratorios participantes o por expertos. Por tanto, permite conocer cómo están funcionando los procedimientos de un

determinado laboratorio en relación con cómo funcionan en otros laboratorios o en relación a los resultados de expertos (Organización Mundial de la Salud, 2010). Por otra parte, los programas de CCExt constituyen la base de la transferibilidad de resultados entre laboratorios.

Además, en la norma UNE 179007, norma que especifica los requisitos para un sistema de gestión de la calidad para centros de reproducción humana asistida, recoge que "La organización debe participar en controles de calidad externos sobre preembriones y gametos y en Registros de Actividad Multicéntricos, con una periodicidad mínima anual".

Los programas de CCExt suelen estar organizados por fabricantes de materiales de control, organismos oficiales u organizaciones científicas. La participación suele ser voluntaria, aunque en algunos países la ley obliga a los laboratorios a participar en programas de CCExt, y sus resultados pueden ser inspeccionados oficialmente.

Cada programa de CCExt establece el número de materiales de control, su frecuencia de distribución y los valores de las magnitudes cuyos procedimientos de medida se desea evaluar, dependiendo todo ello de la finalidad concreta para la que haya sido diseñado.

Debemos recordar en este punto que la manera de participar en los programas de CCExt según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2010) es mediante un miembro del personal de laboratorio que tenga un aceptable nivel en el programa de control de calidad interno (CCIInt).

Además de las características generales sobre la estructura del programa de CCExt, los participantes reciben información sobre el origen de los materiales de control e instrucciones claras sobre su manipulación, estabilidad, condiciones de almacenamiento y fecha límite de entrega de los resultados (Thompson et al., 2006).

Para que un programa de CCExt sea fiable deben cumplirse los siguientes puntos (ISO 15189:2012; Thompson et al., 2006):

1. Los distintos materiales de control de un mismo lote deben ser totalmente homogéneos entre sí y su estabilidad debe mantenerse a lo largo de todo el periodo de control.
2. El número de laboratorios participantes debe ser el mayor posible y la diversidad de los métodos de medida de una misma magnitud también debe ser la mayor posible, con lo que la estimación de los valores consensuados, tanto por método como global, será fiable y permitirá la comparación entre laboratorios que utilizan el mismo método, y una buena estimación del error sistemático.
3. Deben utilizarse materiales de control con diferentes valores de las magnitudes en estudio, intentando abarcar todo el intervalo de medición, o al menos, con valores cercanos a las decisiones clínicas.

Existen dos tipos principales de programas de CCExt analítica: tipo I y tipo II. Las diferencias principales entre ambos tipos son la frecuencia con que se realizan las mediciones en los materiales de control y el hecho de que los valores de esos materiales sean conocidos por los laboratorios participantes o no lo sean.

Tipo I: En estos programas se utilizan los resultados obtenidos de forma esporádica, aunque periódica, por los laboratorios participantes. Se utilizan diversos materiales de control cuyos valores no son conocidos por los laboratorios participantes. Durante los 6 ó 12 meses que suele durar cada ciclo de control, cada laboratorio mide en cada material de control con una cadencia quincenal, mensual o trimestral las magnitudes correspondientes a los procedimientos que se desea controlar y, finalmente, envía los resultados al organizador. Poco tiempo después, el organizador envía a cada laboratorio participante, para cada procedimiento de medida sometido a control, un informe en

el que se comparan los resultados obtenidos por el participante con los obtenidos por los laboratorios que utilizan el mismo método de medida y con los obtenidos por todos los laboratorios participantes, sea cual sea el método con el que miden una misma magnitud. Finalizado el periodo de control, el organizador elabora un informe global en el que evalúa la calidad analítica obtenida por el participante para cada procedimiento y la compara con la obtenida por el resto de los laboratorios participantes. En algunos programas, en el informe correspondiente al final del periodo de control, se indica la clasificación basada en la imprecisión interdiaria y el error sistemático, de cada uno de los procedimientos utilizados por el participante en relación con el resto de los participantes (Ferré y Fuentes, 1998).

Tipo II: En estos programas se utilizan los resultados obtenidos cotidianamente en el CCIInt. En estos programas, cuya duración suele ser de un año o más, los materiales de control pueden estar valorados o no, aunque si no lo están, cada laboratorio participante les asigna sus propios valores. Así pues, los materiales de control se usan cada vez que se realiza una serie de mediciones para controlar los resultados observados en los pacientes. Los resultados de control obtenidos en el CCIInt se envían mensualmente al organizador del programa. A continuación, el organizador envía a cada laboratorio participante un informe en el que consta, para cada procedimiento de medida sometido a control, las medidas y los coeficientes de variación (imprecisión interdiaria) correspondientes a los resultados enviados el mes anterior y los enviados hasta el momento desde el inicio del periodo de control (datos acumulados), así como la media y la desviación típica correspondiente a los resultados de los laboratorios que utilizan el mismo método (valor consensual por método) y la media correspondiente a los resultados de todos los laboratorios, prescindiendo del método empleado (valor consensual global) (Ferré y Fuentes, 1998).

Los resultados obtenidos de un programa de CCEXt nunca deben utilizarse como base para disminuir el error sistemático calculando un factor de corrección para aplicarlo a los resultados observados en las muestras de los pacientes, ya que los materiales de control, frecuentemente no se comportan igual que ellos, porque no son de origen humano, porque contienen sustancias conservantes o porque no son equiparables a los procedimientos habituales.

Valores aberrantes: A veces el resultado enviado por un participante es calificado de aberrante por el organizador. En estos casos debe comprobarse que no se ha cometido ninguna equivocación en la transcripción de los resultados, que se han efectuado correctamente los cálculos y que se ha utilizado el material de control adecuado.

Valores incoherentes: En los programas en que se miden dos materiales de control simultáneamente, puede no existir coherencia entre los dos resultados. En este caso, en primer lugar, se debe considerar un posible cruce de los dos materiales de control. Si no existe tal confusión, se debe consultar el diagrama de Youden (Ferré y Fuentes, 1998), que se suele incluir en estos programas, para deducir el tipo de error.

Un punto clave en los programas de CCEXt es el establecimiento de los intervalos de aceptación de los resultados. La Organización Internacional para la Estandarización (ISO) propone cinco métodos para asignar valores de

referencia (ISO13528:2015) (Tabla I).

PROGRAMAS DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

Los esquemas de CCEXt propuestos para el LRHA y más utilizados en diferentes países son: análisis de semen (concentración de espermatozoides, movilidad, vitalidad, morfología espermática y medición de anticuerpos antiespermatozoide), realización de bioensayos para detectar la toxicidad y las condiciones de cultivo subóptimas, y análisis de imágenes para la evaluación de la calidad y destino clínico de los embriones (Elder y Kastrop, 2003; De Jonge et al., 2003; Castilla et al., 2010). En la Tabla II se muestran otros ejemplos de CCEXt en el laboratorio de reproducción humana asistida.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE ANÁLISIS DE SEMEN

La implantación de programas de CCEXt de análisis de semen es amplia en muchos países, pues desde la tercera edición del manual de análisis de semen humano de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1992) hasta la última edición de este mismo manual, se insiste en la participación en estos programas y se facilita un listado de programas de este tipo, nacionales e internacionales (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En España, tras una experiencia piloto con 18 laboratorios, se instauró en 1999 el primer programa de CCEXt auspiciado

por la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), dicho programa estuvo coordinado con el Comité de control de calidad del Grupo de Interés Especial en Andrología de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) y organizado por el laboratorio CEIFER de Granada. Actualmente el material de dicho programa es también distribuido al programa de CCEXt de Asociación Española de Farmacéuticos Analistas y de la Asociación Española de Biopatología Médica y sus resultados procesados en conjunto (Castilla et al., 2005). El procesamiento de los resultados se realiza de forma anónima, introduciendo los datos por duplicado con verificación de estos en la aplicación informática encargada de su análisis estadístico. Todos los resultados se analizan por técnica y método utilizado, calculándose media, desviación estándar (DS), coeficiente de variación, máximo, mínimo y rango intercuartílico. Se descartan todos los valores que sean $\pm 3DS$ (Álvarez et al., 2005).

El valor de referencia utilizado es el valor obtenido por la media de laboratorios participantes.

Se han descrito diferencias entre programas de CCEXt de análisis de semen (Cooper et al., 2002). Estas podrían estar debidos a los distintos métodos utilizados para definir los valores de referencia en cada programa de CCEXt de análisis de semen (Palacios et al., 2002)

Valor de referencia	Método
1. Formulación	Mezcla de medios
2. Valor de referencia certificado	Materiales certificados CRM
3. Valor de referencia	Comparación con materiales CRM
4. Valor consenso de laboratorios expertos	Valor obtenido por la media de un grupo de laboratorios expertos
5. Valor consenso de los participantes	Valor obtenido por la media de los laboratorios participantes

Tabla I. Métodos para obtener valores de referencia en un programa de CCEXt según la norma ISO13528:2015. CRM: Material de referencia certificado.

Área	Proceso	Actividad	CCExt
Análisis	Análisis de semen		Semen crioconservado
		Determinación de la concentración espermática	Suspensión bolitas látex Suspensión espermática Videos
		Determinación de la movilidad espermática	Semen crioconservado Videos
		Determinación de la morfología espermática	Portaobjetos teñidos y/o fijados Semen crioconservado Videos y/o fotos
		Determinación de la vitalidad espermática	Portaobjetos teñidos Semen crioconservado Videos
		Realización de un test hipoosmótico	Semen crioconservado Videos
		Determinación de anticuerpos anti-espermatozoide directa	Semen crioconservado Videos
		Determinación de anticuerpos anti-espermatozoide indirecta	Sueros
		Recuperación de espermatozoides móviles	Realización de REM con semen congelado
		Procesamiento de células y tejidos	Clasificación embrionaria
FIV/ICSI CT IA	Determinación de la toxicidad de un fungible		Envío material de toxicidad desconocida Comparación de indicadores con otros centros
Crioconservación	Crioconservación de gametos (masculino)		Evaluación externa de semen congelado en el laboratorio
	Crioconservación de gametos (femenino)		Evaluación externa de ovocitos vitrificados en el laboratorio
	Crioconservación de embriones		Comparación del % supervivencia embrionaria con otros centros

Tabla II. Ejemplos de CCExt para actividades de procedimiento (Fase Técnica) (Castilla y Mantilla et al., 2016).

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE EVALUACIÓN EMBRIONARIA.

La evaluación de la calidad embrionaria es clave en el laboratorio, ya que afecta

a la decisión de cuántos y qué embriones transferir, lo cual está directamente relacionado con la eficacia de un ciclo de FIV/ICSI y con la probabilidad de embarazo múltiple.

En España entre 2003 y 2007 existía un programa nacional de CCExt de evaluación embrionaria, organizado por CEIFER y auspiciado por ASEBIR, donde los centros participantes debían catalogar embriones en tres categorías (bueno, regular o malo) y decidir el destino clínico de los embriones (transferir, crioconservar o descartar). El análisis de los resultados de estos años permitió demostrar las discrepancias existentes en evaluación embrionaria entre centros y un panel de expertos (Castilla et al., 2010). A partir de 2011, el programa pasa a ser organizado en su totalidad por ASEBIR y en 2012 se incorpora la clasificación estandarizada publicada por ASEBIR en 2008, pasando los laboratorios a analizar de forma individualizada distintos tipos de variables como número de células del embrión, porcentaje de fragmentación, vacuolización, nucleación y otras características que permiten categorizar al embrión mediante la clasificación embrionaria de ASEBIR (Ardoy et al., 2008). Los laboratorios, al igual que en la etapa inicial, deben tomar una decisión clínica (transferir, crioconservar o descartar) sobre cada embrión.

Nuestro grupo demostró, que la participación en este tipo de programas aumenta el grado de acuerdo entre laboratorios en la evaluación morfológica embrionaria (Castilla et al., 2010).

Tras cinco años de la incorporación, en 2012, de la catalogación estandarizada de ASEBIR al programa de CCExt de evaluación embrionaria, nuestro grupo ha demostrado que pese al alto grado de acuerdo existente entre laboratorios y expertos en la evaluación de embriones de buena calidad siguen existiendo discrepancias a la hora de catalogar los embriones de peor calidad (Martínez-Granados et al., 2018).

En un programa de CCExt para la evaluación de imágenes de embriones, las alternativas posibles para establecer el valor de referencia, dentro de las normas ISO 13528:2015, son los puntos 4 (valor consenso de laboratorios expertos) y 5 (valor consenso de los participantes) expuestos en la Tabla I.

Tanto Arce et al. (2006), que compara los resultados de la evaluación de tres laboratorios de expertos entre ellos y a su vez con los resultados de varios laboratorios locales, como Ruiz de Assin et al., (2009) que compara los resultados entre un grupo de laboratorios y un grupo de expertos, demostraron que la variabilidad entre expertos era inferior a la observada entre laboratorios. Se demostraba la importancia de utilizar valores verdaderos, basados en la opinión de expertos en lugar de basarse los valores de referencia en las opiniones mayoritarias de los centros participantes.

Actualmente, existen programas similares a los descritos para España, en Reino Unido, Estados Unidos y Suiza.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DE EVALUACIÓN EMBRIONARIA CON EQUIPOS TIME-LAPSE

El Grupo de Interés de Calidad de ASEBIR llevó a cabo un ensayo piloto de un CCEExt de este tipo en el año 2014.

Aunque los métodos *time-lapse* proporcionan una gran cantidad de información sobre el desarrollo del embrión, su análisis no está automatizado (Molder et al., 2015). Además, en cuanto a la medición de tiempos en los equipos *time-lapse*, sólo dos estudios han evaluado la variabilidad interobservador, reportando poca variabilidad a este respecto (Sundvall et al., 2013; Martínez-Granados et al., 2017). Actualmente, la mayoría de los estudios que buscan desarrollar algoritmos de clasificación usando equipos de *time-lapse* sólo tienen en cuenta el momento del desarrollo embrionario (Meseguer et al., 2011; Conaghan et al., 2013; VerMilyea et al., 2014; Basile et al., 2015; Milewski et al., 2015; Petersen et al., 2016). Sin embargo, estas plataformas también permiten evaluar embriones mediante la evaluación de características morfológicas clásicas, tales como aspecto de los pronúcleos, simetría, fragmentación y/o multinucleación (Gardner et al., 2016). Ahlstrom et al. (2016) demostraron que esta estrategia es clínicamente más útil que un método de selección de

embriones en el que sólo se analicen los tiempos del desarrollo. Otros autores, utilizando diversas estrategias, han incorporado las características morfológicas clásicas a los algoritmos basados en morfocinética (Conaghan et al., 2013; Diamond et al., 2015; Liu et al., 2016).

Sin embargo, según Lundin y Ahlstrom (2015), el hecho de que los eventos del desarrollo embrionario puedan ser definidos en diferentes momentos (inicial, medio o final), podría dificultar la comparación de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios. Nuestros resultados, tras analizar los datos del ensayo piloto de CCEExt de evaluación morfológica embrionaria (EME) mediante *time-lapse*, parecen confirmar esta hipótesis, observándose un picodevariabilidad entre laboratorios al analizar eventos que tardan más tiempo en producirse como la aparición de los pronúcleos o la compactación. Por el contrario, en eventos que se producen casi instantáneamente, como la división celular o la desaparición de los pronúcleos, la variabilidad observada entre laboratorios fue significativamente menor (Martínez-Granados et al., 2018).

Tras comparar los resultados del ensayo piloto de EME mediante *time-lapse* con los obtenidos en el programa de CCEExt de evaluación morfológica embrionaria clásica (EMEC), no se observó una disminución en la variabilidad entre laboratorios usuarios de equipos *time-lapse* frente a los usuarios de EMEC, en la evaluación de ninguna característica morfológica ni en clasificación de embriones según los criterios ASEBIR (Martínez-Granados et al., 2018). Este resultado es contrario a lo que habría cabido esperar de una menor variabilidad en usuarios de equipos *time-lapse*, y podría deberse en parte, a que muchas características morfológicas embrionaria son transitorias y los criterios para evaluar dichas características no están bien definidos actualmente para los equipos *time-lapse* (Hardarson et al., 2002; Chávez et al., 2012).

A nivel internacional sólo la *External Quality Assurance Schemes for*

Reproductive Medicine propone un CCEExt para equipos *time-lapse* (*External Quality Assurance Schemes for Reproductive Medicine*, 2018).

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO PARA LA REALIZACIÓN DE ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

El material de laboratorio utilizado en los LRHA no debe tener un efecto negativo en la viabilidad de los gametos y embriones. Con el objetivo de identificar aquellos fungibles tóxicos, diferentes guías recomiendan que el material sea testado previo a su uso (Organización Mundial de la Salud, 2010; *ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs* et al., 2016). Existen diferentes bioensayos para este fin (Chan et al., 2001; Elder y Kastrop, 2003; Gardner et al., 2005; Kim et al., 2005), siendo el más utilizado por su facilidad y disponibilidad, el test de supervivencia espermática (TSE) (Lemmolo et al., 2005).

La validez del TSE es crucial para la calidad del laboratorio de andrología y embriología, ya que una mala realización de estos bioensayos podría llevar a utilizar materiales y/o medios embriotóxicos, lo que implicaría una disminución de los resultados, o a desechar materiales y/o medios no tóxicos, lo que provocaría costes extras. En cualquier caso, un buen sistema de bioensayo de materiales y medios llevaría consigo una mejora de resultados con un menor coste.

Con objeto de estandarizar los sistemas de bioensayo, diferentes sociedades científicas han implantado programas de CCEExt de toxicidad (*American Association of Bioanalyst, Fertility Society of Australia*, Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) (Castilla et al., 2010). En estos programas, los centros participantes reciben diversos fungibles tratados o no con sustancias tóxicas y deben responder si el fungible es tóxico o no. Los laboratorios participantes desconocen totalmente si los materiales han sido tratados o el número de fungibles tratados.

Actualmente, no existe una estandarización de estos programas

de CCEExt, y los fungibles enviados a los centros para su evaluación son muy diferentes, desde materiales (puntas de pipeta, catéteres de transferencia, pipetas pasteur, placas petri) hasta medios de cultivo. Se han observado diferencias en los resultados de estos programas de CCEExt, no pudiéndose descartar que se deba a la gran heterogeneidad de productos utilizados. Recientemente, nuestro grupo, analizando los datos del CCEExt realizado por ASEBIR, ha observado una mayor estabilidad en los resultados obtenidos por los laboratorios al analizar puntas de pipeta que en los resultados obtenidos al analizar medios de cultivo. Esta mayor estabilidad de resultados al utilizar puntas de pipeta, unido a que este tipo de fungible es más cómodo logísticamente, lo hace un fungible ideal para este tipo de programas. Sin embargo, el uso de medios de cultivo permitiría analizar pH y osmolaridad, variables que también pueden afectar a la viabilidad de gametos y embriones, por lo que deberían seguir siendo un fungible complementario en este tipo de programas.

CONCLUSIONES

En conclusión, son muchos los procedimientos del laboratorio de reproducción humana asistida susceptibles de ser monitorizados en los programas de CCEExt, siendo tres de estos, los que cuentan con programas consolidados. La participación en estos programas debe complementarse con acciones planificadas de mejorar, en caso de resultados no conformes a las especificaciones establecidas en los sistemas de calidad. Sería deseable, en un futuro, aumentar la cartera de programas de CCEExt disponibles para el laboratorio de embriología.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlstrom A, Park H, Bergh C, Selleskog U, Lundin K. Conventional morphological assessment performs better than morphokinetics for prediction of live birth after day 2 transfer. *Reprod Biomed Online*. 2016;33:61-70.

Álvarez C, Castilla JA, Ramírez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernández A, et al. External

quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J Assist Reprod Genet*. 2005;22:379-387.

Arce JC, Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmggaard L, Sørensen P. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Hum Reprod*. 2006;21:2141-2148.

Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrer R, Moreno JM, et al. Cuadernos de Embriología Clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2ª edición. Madrid: ASEBIR; 2008.

Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*. 2015;30:276-283.

Castilla JA, Mantilla A. Cuadernos de Embriología Clínica. Indicadores de calidad del laboratorio de embriología: definición y especificaciones. 1ª Edición. Madrid: ASEBIR; 2016

Castilla JA, Moracho-Zaragoza J, Aguilar J, Prats-Giménez R, Gonzalvo MC, Fernández-Prado E, et al. Quality specifications for seminal parameters based on the state of the art. *Hum Reprod*. 2005;20:2573-2578.

Castilla JA, Ruiz de Assin R, Gonzalvo MC, Clavero A, Ramírez JP, Vergara F, et al. External quality control for embryology laboratory. *Reprod Biomed Online*. 2010;20:68-74.

Chan PJ, Calinisan JH, Corselli JU, Patton WC, King A. Updating quality control assays in the assisted reproductive technologies laboratory with a cryopreserved hamster oocyte DNA cytogenotoxic assay. *J Assist Reprod Genet*. 2001;18:129-134.

Chávez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun*. 2012;13:1251.

Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, et al. Improving

embryo selection using a computer-automated *time-lapse* image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril*. 2013;100:412-419.

Cooper TG, Bjorndahl L, Vreeburg J, Nieschlag E. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *Int J Androl*. 2002;25:306-311.

De Jonge CJ, Centola GC, Reed ML, Shabanowitz RB, Simon SD, Quinn P. Human sperm survival assay as a bioassay for the assisted reproductive technologies laboratory. *J Androl*. 2003;24:16-18.

Diamond MP, Suraj V, Behnke EJ, Yang X, Angle MJ, Lambe-Steinmiller JC, et al. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32:61-68.

Elder KT, Kastrop P. Control de calidad en laboratorios de fertilización in vitro. *Reproducción Humana [Internet]* 2003; 3 Vol 1: 13-20. [Consultado el 20 de diciembre de 2017] Disponible en: http://www.flasef.org/textos/revista/2003/1/13_20.pdf

ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs, De los Santos MJ, Apter, S., Coticchio, G., Debrock, S., Lundin, K., et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod*. 2016;31,685-686.

External Quality Assurance Schemes for Reproductive Medicine. [Consultado el 26 de marzo de 2018] Disponible en: <http://www.eqasrm.com.au/schemes#embryo-timelapse>

Ferré M, Fuentes X. Control interno de la calidad. En: Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. *Bioquímica clínica y patología molecular*. Volumen I. 2ª edición. Barcelona: Editorial Reverte; 1998.

Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of *time-lapse*, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol. Hum Reprod*. 2016;22:704-718.

Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. Quality control in human in vitro fertilization. *Semin Reprod Med.* 2005;23:319-324.

Haeckel R. Evaluation methods in laboratory medicine. Weinheim, Germany: VCH; 1993.

Hardarson T, Löfman C, Coull G, Sjögren A, Hamberger L, Edwards RG. Internalization of cellular fragments in a human embryo: *Time-lapse* recordings. *Reprod Biomed Online.* 2002;5:36-38.

Lemmolo M, Simmons L, Matson P. The rapid detection of cytotoxicity using a modified human sperm survival assay. *J Assist Reprod Genet.* 2005;22:177-180.

ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva: International Organization for Standardization; 2015.

ISO 15189. Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

Kim JJ, Patton WC, Corselli J, Jacobson JD, King A, Chan PJ. Mouse embryonic stem cells for quality control testing in assisted reproductive technology programs. *J Reprod Med.* 2005;50:533-538.

Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matosn P. *Time-lapse* deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril.* 2016;105:656-662

Lundin K, Ahlstrom A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod Biomed Online.* 2015;31:459-471.

Martínez-Granados L, Serrano M, González-Utor A, Ortiz N, Badajoz V, López-Regalado ML, Boada M, Castilla JA; Special Interest Group in Quality of ASEBIR (Society for the Study of Reproductive Biology). Reliability and agreement on embryo assessment: 5 years of an external quality control programme. *Reprod Biomed Online.* 2018;36:259-268.

Martínez-Granados L, Serrano M, González-Utor A, Ortiz N, Badajoz V, Olaya E, Prados N, Boada M, Castilla JA; Special Interest Group in Quality of ASEBIR (Spanish Society for the Study of Reproductive Biology). Inter-laboratory agreement on embryo classification and clinical decision: Conventional morphological assessment vs. time lapse. *PLoS One.* 2017;12:e0183328.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26:2658-2671.

Milewski R, Ku P, Kuczy ska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczy ski W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in *time-lapse* monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32:571-579.

Molder A, Drury S, Costen N, Hartshorne GM, Czanner S. Semiautomated analysis of embryoscope images: Using localized variance of image intensity to detect embryo developmental stages. *Cytometry A.* 2015;87:119-128.

Organización Mundial de la Salud. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5ª edición. Geneva: OMS; 2010.

Organización Mundial de la Salud. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3ª edición. Geneva: OMS; 1992.

Palacios ER, Clavero A, Gonzalvo MC, Rosales A, Mozas J, Martínez L, Ramírez JP, Björndahl L, Morancho-Zaragoza J, Fernández-Pardo E, Castilla JA. Acceptable variability in external quality assessment programmes for basic semen analysis. *Hum Reprod.* 2012;27:314-322.

Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on day 3. *Hum Reprod.* 2016;31:2231-2244.

Ruiz de Assin R, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramirez JP, Zamora S, Fernández A, et al. Comparison of methods to determine

the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reprod Biomed Online.* 2009;19:824-829.

Sundvall L, Ingerslev HJ, Knudsen UB, Kirkegaard K Inter- and intraobserver variability of *time-lapse* annotations. *Hum Reprod.* 2013;28:3215-21.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2006;78:145-196.

UNE 179007. Health services. Systems of quality management for assisted reproduction laboratories. 2013.

VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani, K, Gvakharia M, et al. Computer-automated *time-lapse* analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. *Reprod Biomed Online.* 2014;29:729-736.

PRIMO VISION EVO +

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



- » Cámara HD 5 Mpx, 0,3 pixel/micra, aprox. 25x
- » Software Premium para medidas de fragmentación y asimetría de los blastómeros
- » Cultivo en grupo

Vitrolife 

G - TL

PRIMER MEDIO ÚNICO DISEÑADO
ESPECÍFICAMENTE PARA TIME-LAPSE



Vitrolife 

G - 210

OTRO NIVEL SUPERIOR EN LA
INCUBACIÓN DE EMBRIONES



- » Software que emula el ciclo basal natural
- » Cámaras de incubación (10 + 1) calefactadas por los 6 lados
- » Con EM Neutra tech. para evitar campos magnéticos en los cultivos

SYSTEMS

KIVEX BIOTECH LTD

Micropipetas VITROLIFE

MICROPIPETAS DE ALTA CALIDAD
Y PRECISIÓN



- » Toda gama de tipos y angulaciones
- » Control de calidad -1 cel-MEA > 80% blastocito día 5
- » Todas las micropipetas son inspeccionadas individualmente

Vitrolife 



www.embiol.com



RI Witness™

SISTEMA DE TRAZABILIDAD POR RADIOFRECUENCIA

GARANTIZA LA MÁXIMA SEGURIDAD EN LOS TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA



www.embiol.com



PRIMER RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA ENCUESTA LANZADA POR LA JUNTA DIRECTIVA

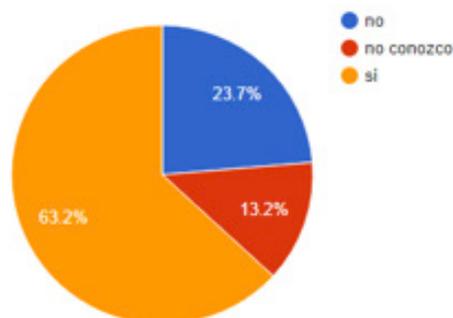
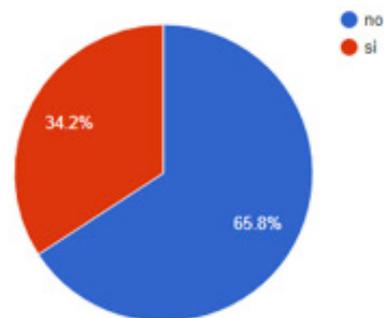
Como se ha ido anunciando durante este año, uno de los objetivos principales de la actual Junta Directiva de ASEBIR es habilitar sistemas de información dentro de nuestra comunidad. Y para ello, si la primera medida fue hacer una *Newsletter* ágil, la segunda fue lanzar una encuesta para conocer de primera mano la opinión y las demandas de los asociados, para no perder de vista la opinión de todos.

Desgraciadamente, la respuesta a la encuesta está siendo escasa, con una mínima participación y sólo 76 respuestas. Gracias a todos los que dedicasteis un poquito de vuestro tiempo a darnos vuestra opinión.

A continuación, esbozamos algunos de los resultados, los que han impulsado ya a actuar:

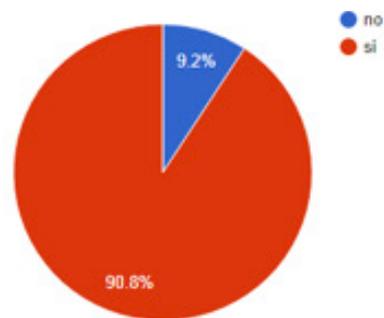
Delegados Autonómicos ¿Sabes de su existencia?

La figura de delegado autonómico se activó en 2009 para reforzar la presencia de ASEBIR en cada Comunidad Autónoma en el tema de la acreditación de los embriólogos clínicos y desde entonces no se ha actualizado. Se ha agradecido la disponibilidad de los socios que fueron nombrados delegados autonómicos y se ha decidido cesarlos momentáneamente, considerando que ahora mismo no tienen tarea asignada. En caso de necesidad, se reintroduciría una renovación de dichos puestos más adelante.



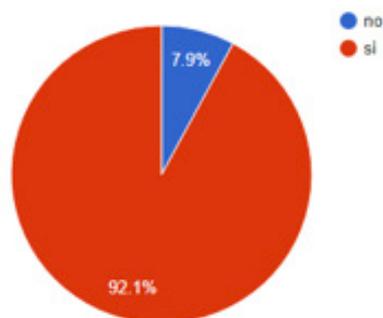
¿Conoces el papel de ASEBIR en la revista MEDRE?

Más del 30% de nuestros asociados no conocen nuestra participación en la revista MEDRE, que fue un esfuerzo enorme y conjunto de la SEF y ASEBIR para llegar a una publicación científica de nivel e indexada. Los presidentes de estas dos asociaciones ya se han reunido para valorar el funcionamiento de la revista y decidir si se mantiene el formato actual o se busca otro modelo.



¿Verías interesante la creación de una app específica de ASEBIR que pudiera utilizarse también en Congresos, votaciones...?

Se está trabajando en ello.



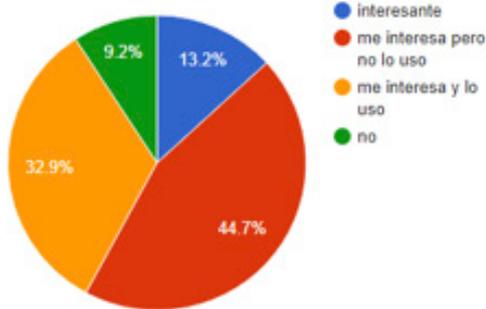
¿Crees que deberíamos potenciar el acceso de ASEBIR a las redes sociales?

También se está trabajando en esta dirección, y os recordamos que podéis seguir ASEBIR en Twitter @ASEBIRreprod que, a día de hoy, tiene 240 seguidores.

Valora los servicios concertados desde ASEBIR. Seguro de Responsabilidad Civil

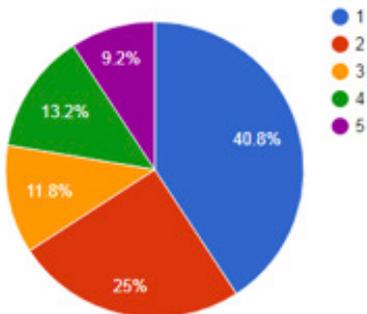
Hay fecha para una reunión con la aseguradora. Creemos que podemos reconducir a este 50% personas interesadas pero que no lo usan, quizás incorporando el seguro obligatorio para los embriones criopreservados.





Valora los servicios concertados desde ASEBIR. Control de calidad

Considerando que el control de calidad es imperativo, se están estudiando qué modelos existen aquí y en otros países y qué oferta encajará más en nuestros centros. Se marca el objetivo de reducir sensiblemente este 45% de personas que están interesadas en el control de calidad pero no lo usan.



¿Cómo valoras el trabajo de la Comisión por la Especialidad?

Se ha replanteado completamente el enfoque en pro de la consecución del reconocimiento de la especialidad y ahora se elaboran propuestas conjuntamente con los Colegios Oficiales de Biólogos. Por lo tanto, la comisión queda en *stand-by*. Se han hecho reuniones con el Director General de Ordenación Profesional, del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar social para la inclusión de la embriología en el Registro de Profesionales Sanitarios que ya debería estar implementado en España.

Como ya hemos dicho al inicio, esperamos que la participación en esta encuesta aumente su participación, ya que para la Junta Directiva es una herramienta muy útil a la hora de conocer la opinión de las/los asociadas/os. Os animamos a responderla para que sea un termómetro del sentimiento y de las demandas en ASEBIR, y así, en el próximo boletín, ya podremos informaros de nuevas medidas.

Genea
BIOMEDX
Gavi

TECNOLOGÍA
PARA LA VIDA

ESTANDARIZA EL PROCESO DE VITRIFICACIÓN CON Gavi®



Gavi® automatiza el equilibrado del proceso de vitrificación, **disminuyendo la variabilidad** entre usuarios



Sistema de vitrificación **cerrado** con una tasa de supervivencia de blastocistos del **97%¹**



Información reservada a profesional sanitario. Gavi® es conforme con la legislación vigente de productos sanitarios.

Para más información consulte las instrucciones de uso.

Si desea más información contáctenos a través del correo electrónico InformacionFT@merckgroup.com

1. Genea Data on file QRTV224_07
ES/GAVI/1018/0003 (octubre 2018)

MERCK

POR LA TRANSPARENCIA

Una de las peticiones más recurrentes que nos ha llegado desde los asociados es la **falta de información** sobre los entresijos que rodean el funcionamiento de una sociedad científica como ASEBIR. Por ello, desde la **Junta Directiva** nos hemos propuesto facilitaros información de forma global sobre los temas más interesantes tratados en nuestras juntas, tanto por vídeo conferencia como presenciales. Nos vamos a estrenar con datos sobre la última reunión presencial mantenida en Madrid el pasado **12 de noviembre** a la que asistieron la totalidad de los miembros de la Junta.

Como en cualquier junta o asamblea general, la reunión se distribuye en informes de presidencia, secretaría, tesorería y cada una de las vocalías.

En esta ocasión invitamos a asistir también a los **presidentes de todos los Grupos de Interés** (Andrología, Calidad, Criobiología, Embriología y Genética) a fin de que plasmaran todas aquellas iniciativas que pudieran revertir en un mejor funcionamiento de dichos grupos.



La Junta Directiva y los Presidentes de los GGII



Presidentes de los GGII, Nereyda Ortiz, Mark Grossmann, Victoria Hurtado de Mendoza, Mireia Sandalinas y José Luis Girela.

Pasamos a resumir los temas más importantes tocados durante la reunión:

1. INFORME DE PRESIDENCIA

. **La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida** ha renovado su composición, siendo Antonio Urries miembro del comité técnico permanente de dicha comisión en representación de ASEBIR y Mark Grossmann como vocal en representación del Consejo General de Colegios Oficiales de Biólogos.

. **Profesionales Sanitarios:** Va a comenzarse una campaña divulgativa y de difusión de la problemática que genera nuestra falta de regulación profesional a través de distintos medios de comunicación y con mesas redondas en las universidades (en esta misma revista podéis ver la primera mesa redonda convocada en la Universidad de Murcia). La siguiente será en Enero en Madrid.

. Se han mantenido reuniones/conversaciones con:

- **Luis Martínez (presidente de la SEF)** con la idea de generar sinergias y una mejor organización sobre temas comunes (normalización de los representantes de ASEBIR en los Grupos de Trabajo de la SEF, impulso e indexación de la revista MEDRE, propuesta de Jornada conjunta ASEBIR/SEF,...). Pendientes de avanzar en próxima reunión.

- **Representantes de las diferentes casas comerciales.** En todos los casos se nos ha manifestado interés en incrementar las colaboraciones con ASEBIR, mostrando un interés especial en organizar cursos que puedan resultarnos de interés y que puedan realizarse vía online o en ciudades con fácil acceso. Se admiten ideas tanto de los Grupos de Interés como de cualquier asociado.

.**Varios:** Se han recibido solicitudes por parte de asociados para organizar listados con centros dispuestos a facilitar estancias formativas a quien pueda tener interés. Todos aquellos centros que estén dispuestos a recibir personal en formación que den sus datos a secretaría.

2. INFORME DE TESORERÍA

Tras la presentación de cuentas se concluye que nuestra asociación tiene las cuentas **saneadas**, pero por propuesta en el anterior congreso (Madrid 2017) de uno de los asociados de incrementar las cuotas, se procederá a presentar a votación en la asamblea general a realizar en Cáceres 2019 una propuesta de **incremento de cuotas** a los asociados en activo.

3. INFORME DE SECRETARÍA

Se deja constancia del problema que supone el no tener los **datos** de contacto de los asociados **actualizados**. Ello origina que no les llegue puntualmente la información remitida desde ASEBIR. Por este motivo queremos insistir a todos los asociados a entrar en la web de ASEBIR para actualizar sus datos.

También se está trabajando en ampliar la cobertura del **seguro de responsabilidad civil** presentado por Segurmec a fin de que incluya conceptos que actualmente no contempla como es el de transporte de embriones. Os mantendremos informados.

4. INFORME DE VOCALÍAS

Congresos y Publicaciones

Se informa de que el **programa del congreso** ya está cerrado, así como los **cursos pre-congreso**.

Se ha invitado a representantes de **sociedades hermanas** de otros países (Italia, Portugal, Mexico...) para un mayor acercamiento entre asociaciones.

Nuestra próxima **revista OnLine** ya está preparada (es la que tenéis en vuestras manos) y se comenzará su difusión a principios de Enero para evitar recibirla en periodo de vacaciones de Navidad.

Docencia y Formación

Se está trabajando en una **revisión** de las normas y condiciones de acceso a las becas, cursos online y presenciales. Os informaremos cuando esté actualizado.

La Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (**Red Lara**) con casi 200 centros adscritos han mostrado interés en nuestros cursos Online de formación, por lo que se les va a facilitar el acceso a través de nuestra plataforma de formación.

En base a las conversaciones mantenidas con Colegios Profesionales, Universidades y organismos oficiales en busca de nuestro reconocimiento profesional se decide **prorrogar los exámenes de Certificación ASEBIR sine die** como vía prioritaria para conseguir dicho reconocimiento. Por otra parte no podemos recomendar en este momento la **Vía de Novo** ya que desconocemos la validez oficial que pueda tener en el momento de su finalización.

TIC

Se está trabajando en la creación de una **app** propia de ASEBIR. Posiblemente ya dispondremos de ella para el próximo congreso. También se va a trabajar en la **mejora de la plataforma** para los cursos online.

Grupos de Interés

De forma simultánea a la realización de la Junta se citaron a todos los **presidentes de los Grupos de Interés**, reunión a la que asistieron Belén Buch y Mark Grossmann con el fin de intercambiar opiniones en la búsqueda de un mejor funcionamiento de una parte tan fundamental para ASEBIR como son estos grupos de trabajo.

Posteriormente, a las 14:30, se celebró una **puesta en común** con las conclusiones a dicha reunión, entre las que podemos destacar:

Descontento general por la **escasa participación** de los integrantes de dichos grupos. Hay grupos de interés con más de 50 integrantes de los que sólo tienen una participación activa entre 6 y 8 personas. Se plantea **modificar los estatutos** para reducir el número de miembros y hacer más operativo su funcionamiento. Quedamos a la espera de las sugerencias presentadas por los distintos grupos para su modificación.

Se hace llegar a todos los grupos el interés por parte de distintas empresas de **colaborar en la realización de cursos** de forma periódica, por lo que van a plantear **distintos temas** para cursos que consideremos puedan resultar de interés a los asociados.

Igualmente se remarca la importancia de que dichos cursos se hagan en **lugares de fácil acceso** para los asociados o que puedan realizarse de forma itinerante por distintas ciudades.

Solicitan la revisión de la **compensación económica al profesorado**, ya que está totalmente desproporcionada (a la baja).

El GI de Embriología plantea la posibilidad de crear una **plataforma** donde poder “colgar” imágenes para clasificación interactiva en colaboración con el GI de Calidad.

Por parte de la Junta se recuerda a los GI del compromiso de **facilitar artículos formativos** para la revista, que sirvan como respaldo para el examen de Certificación de ASEBIR.

Se va a valorar la posibilidad de celebrar de forma bienal una **jornada de los Grupos de Interés**. Se comenta la importancia del **Registro de PGT (DGP)** y la poca participación que está teniendo. Igualmente queda remarcado el poco uso que se da al **Foro**. Se considera que la reunión ha sido muy productiva, por lo que se plantea **repetirla** en sucesivas ocasiones.

RUEGOS Y PREGUNTAS

Por petición de distintos asociados a través de la encuesta realizada se va a trabajar en los siguientes temas:

Ampliar los servicios concertados desde ASEBIR (empresas de control de aire, control de calidad en laboratorios,...)

Se insiste en **mayor transparencia** por parte de la Junta, algo que vamos a intentar solucionar, pero a lo que rogamos actualicéis vuestros datos de contacto y tengáis una **participación más activa** en las encuestas y eventos organizados desde ASEBIR.

Varios asociados preguntan sobre la formación y tareas de las **distintas comisiones existentes** en ASEBIR (delegados autonómicos, grupos de trabajo, representaciones, ...) por lo que vamos a revisar su composición y funciones y el sentido de su existencia.

Junta Directiva de ASEBIR
Noviembre 2018

Genea
BIOMEDX
Gems

**TECNOLOGÍA
PARA LA VIDA**

TU GAMA DE MEDIOS DE CULTIVO



Marcado CE en todas las referencias



Con **etiquetas de colores** para la **correcta identificación** del medio



Geri® Medium (medio único) para una incubación **sin perturbaciones**

Información reservada a profesional sanitario. Gems®(*) y Geri® son conformes con la legislación vigente de productos sanitarios. Para más información consulte las instrucciones de uso.

Si desea más información contáctenos a través del correo electrónico InformacionFT@merckgroup.com.

* Si uno de los componentes del medio es gentamicina, el producto no debe administrarse a pacientes con alergia confirmada a la gentamicina o compuestos similares.

ES/GEMS/1018/0004 (octubre 2018)

MERCK

GANADORES I CONCURSO DE FOTOGRAFÍA ASEBIR



Estamos plenamente emocionados de la alta participación que ha tenido el I Concurso de Fotografía ASEBIR con motivo del 25º Aniversario de ASEBIR que se anunció en el primer trimestre del año y que concluyó el pasado 22 de noviembre, en el que se han recibido fotografías, montajes, viñetas, etc. de una excelente calidad y nivel.

Actuando como jurado la Junta Directiva, y siendo uno de ellos el encargado de elegir la ganadora en caso de empate, las fotos ganadoras han sido las siguientes:

1r PREMIO

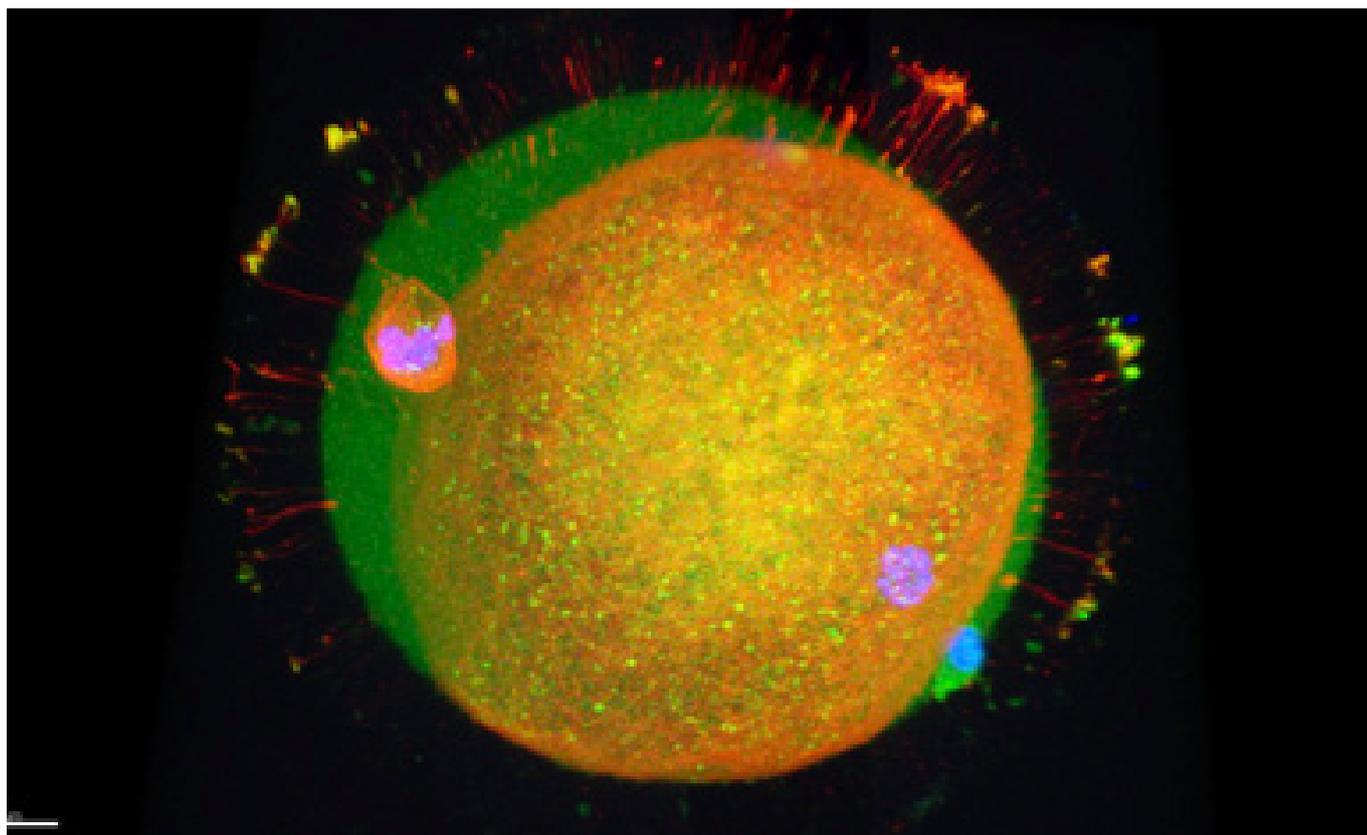
Título: “Lo esencial es invisible a los ojos”- Antoine de Saint-Exupéry

Descripción: Tinción con faloidina (rojo), DAPI (azul) y anti-AQP3 (verde). Ovocito MII bovino.

Autores: Tania García Martínez (nº socio 1218) y Meritxell Vendrell Flotats. Colaboradora: Iris Martínez Rodero (nº socio 1200).

Siendo Tania García Martínez quién presenta esta fotografía como principal autora.

Como ganadora del primer premio, podrá disfrutar de una inscripción gratuita al X Congreso ASEBIR que se celebrará en Cáceres el próximo mes de octubre.





2n PREMIO

Título: Criobiología 1.

Descripción: Cristales de hielo.

Autora: Ana Munuera (Socio 960).

Como ganadora del segundo premio del I Concurso de fotografía, podrá realizar inscripción gratuita a uno de los cursos precongreso que se celebrará en el X Congreso ASEBIR en Cáceres.

¡Enhorabuena a las dos ganadoras!

¡Y esto no acaba aquí! Queremos darle continuidad a este concurso y abrimos el plazo para la participación en el **II Concurso de Fotografía ASEBIR** que dará inicio con la publicación de esta revista y del cual recibireis la información en el correo electrónico. Dispondremos de nuevos premios y, recordad que las imágenes irán siendo usadas en las distintas publicaciones ASEBIR o asociaciones afines.

¡¡¡Animaos a participar!!!

Genea
BIOMEDX
Geri

TECNOLOGÍA
PARA LA VIDA

SACA EL MÁXIMO PARTIDO DE Geri®
CON Geri® ASSESS 2.0



Geri® tiene seis cámaras de incubación independientes con tecnología **Time-Lapse**¹



Geri® Assess 2.0 detecta automáticamente los principales eventos del desarrollo del embrión^{2,3}



Geri® Assess 2.0 permite al usuario incorporar algoritmos personalizados^{2,3}



Información reservada a profesional sanitario. Geri®, Geri® Connect y Geri® Assess son conformes con la legislación vigente de productos sanitarios. Para más información consulte las instrucciones de uso.

Si desea más información contáctenos a través del correo electrónico InformacionFT@merckgroup.com

1. QFRM422 Geri® manual de usuario. 2. QFRM794 Geri® Connect y Geri® Assess manual de usuario. 3. QRTF285 Geri 6.0 y GC&GA 2.0 resumen de pruebas. ES/GERI/1018/0007 (octubre 2018)

MERCK

III CONVOCATORIA DE BOLSAS DE VIAJE PARA ESTANCIAS EN EL EXTRANJERO. CONVOCATORIA 2018/2019

El 31 de octubre finalizó el plazo de presentación de las solicitudes para la III CONVOCATORIA DE BOLSAS DE VIAJE PARA ESTANCIAS EN EL EXTRANJERO. Las solicitudes recibidas fueron evaluadas por una Comisión de Investigación convocada *ad hoc* por la Junta Directiva, estando formada por representantes de las diferentes comisiones permanentes de los grupos de interés de ASEBIR y presidida por la Vocalía de Formación y Docencia.

Comisión de Investigación

- Raúl Noblom – Gi Criobiología • Vicente Badajoz – Gi Calidad • Carme Pons – Gi Embriología • Jose Luis Girela – Gi Andrología
- Silvia Mateo Cuadros – Gi Genética

Vocalía de formación y docencia de ASEBIR: • Antonio Alcaide • Cristina Camprubi • Xavier Vendrell

La beca ha sido concedida, este año, a la socia de ASEBIR Nº 1200, Iris Martínez Rodero, para realizar una estancia en la Kepler Universitätsklinikum GmbH, Linz, Austria, de la mano del Dr. Thomas Ebner, del 11 al 24 de marzo de 2019. Actualmente Iris Martínez desarrolla su tesis doctoral en el laboratorio de Fecundación *In Vitro* de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, dirigida por la Dra. Teresa Mogas. Centrado en el modelo bovino, el proyecto en el que se encuadra su tesis pretende investigar los mecanismos celulares implícitos en la vitrificación y mejorar sus resultados en la mencionada especie.

El objetivo de su estancia es que aprenda, de manos del Dr. Ebner, la técnica de colapso artificial del blastocite, tanto con pipeta de ICSI como mediante láser.

Esperamos con interés ver la Memoria de las actividades realizadas y de los resultados obtenidos tras su estancia.

¡Enhorabuena de nuevo, Iris!

Genea
BIOMEDX
Gidget

TECNOLOGÍA
PARA LA VIDA

SISTEMA DE TRAZABILIDAD PARA
LA SEGURIDAD DE SU CLÍNICA



Flexibilidad para adaptarse a los procesos de cada clínica ¹



Ofrece una visión general del estado de trabajo del laboratorio gracias al **Dashboard** ¹



Instalación sin necesidad de cambios estructurales en el laboratorio ¹



Si desea más información contáctenos a través del correo electrónico InformacionFT@merckgroup.com

1. QFRM883 Gidget User Manual
ES/NONF/1018/0118 (octubre 2018)

MERCK

PARTICIPA EN LAS JUNTAS DE NUESTRA ASOCIACIÓN

En esta edición os hemos hecho llegar la información relacionada con la última reunión de La Junta Directiva, y a partir de ahora queremos escuchar aquellas ideas que queráis que se discutan en nuestra asociación.

De esta manera, cuando la Junta Directiva vaya a reunirse para debatir o gestionar diferentes temas, abrirá un plazo de tiempo previo a la reunión para que podáis enviarnos aquellas propuestas sobre las que os gustaría que se hablara en la reunión de la Junta.

Todos podemos participar en la gestión de nuestra sociedad. Y cuando pase la reunión, informaremos a los asociados de los puntos tratados y todo aquello que se vaya realizando.

No se revelará la identidad del socio que emite la consulta, a menos que el participante así lo desee. Aquello que se decida en Junta, será comunicado al socio que formule la consulta y si el tema fuera de interés para todos los asociados, se emitirá una *newsletter* para hacerlo extensivo a todos.

SOCIO EMÉRITO

El Dr. Luis Salvador Montoro Buils (socio de ASEBIR N° 782) ha sido nombrado Socio Emérito conforme a lo establecido en los estatutos de nuestra asociación (capítulo II, artículo 9).

Con este nombramiento ASEBIR reconoce la labor desarrollada a lo largo de su carrera profesional en el campo de la Reproducción Humana Asistida en España.

MERCK, tu aliado en fertilidad en todas las etapas del proceso



AÚN QUEREMOS SABER TU OPINIÓN

Y seguimos queriendo saber tu opinión para adaptar ASEBIR lo máximo posible a lo que todos necesitamos. Recuerda que la encuesta sigue disponible y lo estará hasta aproximadamente finales de febrero. Nos interesa saber qué opináis para poder “personalizar” la información que os llega a través del correo y/o página web, así como los servicios.

En la edición de esta revista, hemos puesto a vuestra disposición los resultados disponibles hasta el momento; si hubiera novedades, serán informadas en la siguiente edición, momento en el que habrá concluido el acceso a la encuesta.

ASEBIR espera impaciente vuestra participación. Podréis acceder a la encuesta desde la página principal de ASEBIR (<http://asebir.com>).

Recuerda: *Nada cambia, si no cambiamos nada.*

PRÓXIMO CONGRESO ASEBIR – CÁCERES 2019



Os recordamos que el X Congreso ASEBIR se celebrará en el Palacio de Congresos de Cáceres los días 23, 24 y 25 de octubre de 2019.

Esperamos vuestra participación con mucho entusiasmo, id calentando motores y preparando vuestras comunicaciones.

La página web del congreso estará disponible a lo largo del mes de enero, y la secretaría os informará debidamente cuándo podréis acceder a ella y a toda la información sobre el mismo.

ACTUALIZACIÓN DE DATOS DE LA PÁGINA WEB DE ASEBIR

Debido a los grandes y rápidos cambios que se van produciendo en relación a nuestra **acreditación como profesionales sanitarios**, es más importante que nunca tener actualizados los datos para que no os perdáis nada de lo que va ocurriendo.

¿Hace mucho que no accedes al área de socios de ASEBIR? Accede y actualiza tus datos.

¿Has olvidado tu contraseña? ¿Tu usuario?... No hay problema. Ponte en contacto con ASEBIR a través del teléfono 91 367 89 94 y coméntalo con M^a José, que estará encantada de poder ayudarte a recuperar tus datos.

CURSO GIE: ASPECTOS PRÁCTICOS SOBRE EL CULTIVO, CLASIFICACIÓN, BIOPSIA, VITRIFICACIÓN Y DESVITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS HUMANOS (2ª EDICIÓN)

El pasado 15 de noviembre tuvimos la suerte de a poder asistir nuevamente al curso organizado por el Grupo de Interés de Embriología con la intención de rememorar lo vivido en el congreso de Madrid y que fue un éxito.

Durante esta jornada pudimos disfrutar de la presencia de reconocidos y prestigiosos participantes que nos mostraron y lograron abrir debates acerca de temas muy candentes dentro de la reproducción asistida en la actualidad.

En esta 2ª edición del curso, sí pudimos contar con la presencia de Joe Conaghan, que tuvo que ausentarse la vez pasada por diversos motivos, y aunque Marcos Meseguer no pudo asistir en esta ocasión, Alberto Tejera hizo una magnífica presentación en su lugar.

Como invitados pudimos contar con la presencia de:

Mª Victoria Hurtado e **Irene Cuevas** como organizadoras del evento, además de la charla presentada por Irene Cuevas acerca de la situación en España acerca del cultivo a blastocisto.

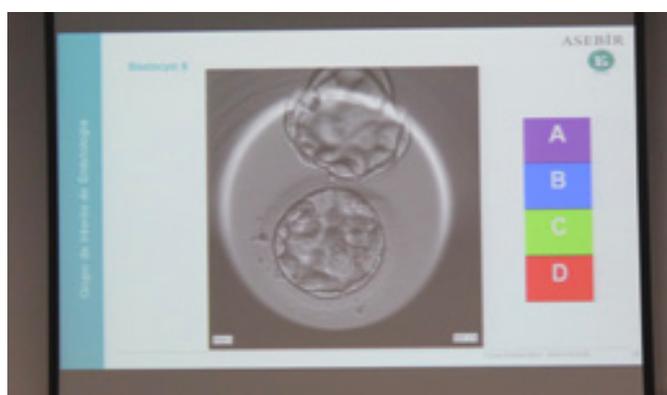


Arantza Delgado y **Mª Carme Pons** que pusieron a prueba la clasificación de ASEBIR para el estadio de blastocisto y que resultó muy interesante poder ver cómo la subjetividad puede cambiar la clasificación de un embrión en función del observador, del día, de los embriones observados en el momento que estamos clasificando o del estado de ánimo de la persona que evalúa.

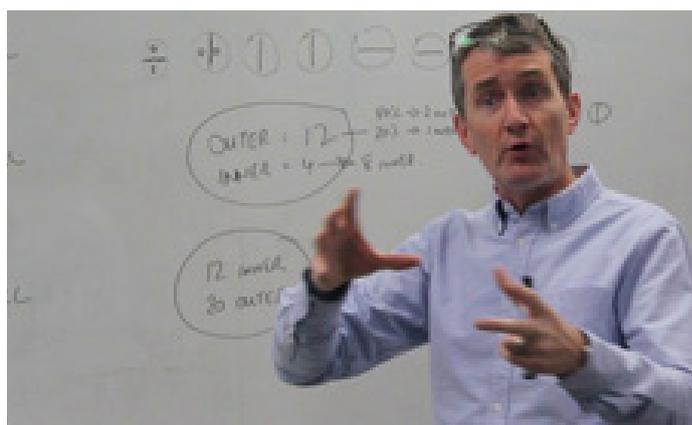




Presentaron casos que llenaron de exaltación a la sala y generaron muchísimo debate:



Tras el intenso debate generado en la esta parte práctica, se hizo una pequeña pauta, donde uno de los ponentes, Joe Conaghan, improvisó una clase magistral sobre parte de las discusiones generadas durante la sesión y el doctor nos explicó acerca de su experiencia en el tema, generando gran expectación entre todos los asistentes con su explicación. Fue un momento realmente impresionante.



Siguiendo con las charlas, **Alberto Tejera** presentó su tema respecto al *Time-lapse* y el cultivo a blastocisto.



Mientras que **Joe Conaghan** explicó las técnicas usadas en la vitrificación de blastocistos para mejorar la supervivencia del mismo.



Finalmente, **Miquel Solé**, nos ponía al día acerca de la vitrificación de blastocistos en España y presentó los resultados de una encuesta realizada a los socios ASEBIR acerca de diferentes aspectos del laboratorio y que tuvo gran aceptación.



El conjunto de ponentes se reunió al final para poder exponerse a las preguntas que habían ido surgiendo sobre los temas y cada uno de ellos respondió a las preguntas de los asistentes.

Al concluir la sesiones teóricas, se montó una comida tipo *buffet* que permitía a los asistentes ir picoteando entre las sesiones prácticas que se establecieron 6 grupos de trabajo distribuidos con los diferentes ponentes y durante toda la tarde se estuvieron practicando las diferentes técnicas:

- Microinyector con láser para la realización de biopsia de blastocisto (2 puestos).

- Criopreservación automática.
- Criopreservación a 37° de temperatura
- Vitrificación / Desvitrificación asistida mediante láser
- Diferentes soportes y medios para la vitrificación

Para



concluir, tuvimos la oportunidad de charlar un poco con nuestros ponentes y hacerles unas pocas preguntas.

ASEBIR ENTREVISTA A LOS PONENTES

ASEBIR: *Queremos hablar con M^a Victoria, nuestra presidenta del Grupo de interés de Embriología, cuéntenos, ¿En qué se basa el GIE a la hora de poner en marcha sus cursos?*

M^a Victoria: La verdad es que la dinámica de los cursos, tanto online como presenciales, que hemos realizado hasta la fecha se han ido sucediendo de forma natural. A partir de plantearnos el reto que nos dejó mi admirada predecesora M^a José de los Santos para publicar la tercera edición del Cuaderno de Embriología, se hacía necesario la divulgación de los criterios ASEBIR. Por lo tanto, nos centramos en la divulgación en todos los foros posibles y la creación de cursos al respecto. Posteriormente, la entrada en los laboratorios del Time lapse nos llevó a realizar un curso online donde englobar la clasificación clásica, que al ser dinámica está abierta a todos los cambios que se produzcan, y el time lapse.

De cara al Congreso ASEBIR en Madrid 2017, la tendencia al cultivo largo se estaba imponiendo en un gran número de centros en nuestro país, y consideramos que era imprescindible realizar un curso precongreso en esta línea. Fue un gran éxito por varias razones, entre otras, que se realizaba en colaboración con otro grupo de interés, el Grupo de Interés de Criobiología.

A la vista de la demanda de este tipo de información, consideramos que si al curso lo dotábamos de una parte práctica el interés sería aún mayor. Y así ha sido, en un año hemos realizado un curso presencial en abril junto al GICa y otro realizado íntegramente por el GIE este pasado tal día como hoy.

No quiero dejar de resaltar que sin el apoyo de los patrocinadores, que han entendido nuestro espíritu de mostrar y poner al alcance de los asistentes todos sus productos más novedosos en el mercado sin que haya conflictos de interés, los cursos hubieran sido menos atractivos para los asistentes.

ASEBIR: *¿Cómo se dirigen los cursos del GIE?*

M^a Victoria: La dirección de los cursos es una tarea muy dura, en la sombra y poco valorada. Pero eso sí, hasta la fecha, los resultados obtenidos, tanto a nivel profesional como humano, han sido muy satisfactorios.

Una vez se decide el programa del curso entre todos los miembros de la permanente, se valoran los posibles ponentes. Siempre buscamos ponentes de peso para nuestros cursos porque consideramos que es una magnífica oportunidad para los asistentes, y nosotros, el poder contactar con ellos. Si queremos cursos de calidad, hay que invertir en ello. Menos mal que los ponentes, hasta la fecha, se han volcado y disfrutado tanto como nosotros en los cursos.

Por otro lado, hemos trabajado buscando patrocinio para afrontar los gastos del curso, trabajo nada fácil. Gracias a la implicación de los patrocinadores en los cursos han salido adelante.

Como queremos que nuestros cursos tengan créditos hay que rellenar las solicitudes y enviarlas. En el último curso presencial, abril, nos han concedido 1,2 créditos que no está nada mal.

El éxito de este curso presencial que acabamos de realizar, codirigido por Irene Cuevas y yo misma, así como el anterior, se debe, por un lado a que los asistentes pueden conocer de primera mano los productos que hay en el mercado y por otro, a que contamos con unas instalaciones inigualables como es el laboratorio de la unidad de Reproducción Asistida del Hospital General Universitario de Valencia, cuya directora Irene Cuevas (vocal del GIE) nos brinda generosamente. Hay un trabajo de preparación del laboratorio, la víspera del curso, organizando la disposición de los equipos, del material a utilizar, etc. que llevamos a cabo los miembros del GIE que participamos en el curso.

En fin, es trabajo de la dirección llevar a término los cursos, pero también de los miembros de la comisión del GIE y, como no, del apoyo incondicional de las dos Juntas Directivas con las que hasta la fecha he tenido la suerte de trabajar como Presidenta del Grupo de Interés de Embriología. A todos GRACIAS.

ASEBIR: *Gracias a vosotros por vuestro esfuerzo... Seguimos hablando con Irene Cuevas, a la que tenemos algunas cosas que nos gustaría nos contase... Buenas tardes, Irene, qué gran trabajo el realizado hoy aquí.*

Irene: Buenas tardes... La verdad es que sí, pero vale la pena cuando ves que la gente sale contenta y hablando de cómo han podido disfrutar del curso.

ASEBIR: *Déjanos Irene que nos aprovechemos de tu situación para preguntar acerca de ciertos temas de interés general. Dinos, ¿qué porcentaje de ciclos o centros hacen cultivo a blastocisto en España?*

Irene: Según los datos del último Registro Nacional de Actividad 2016 - Registro SEF, podemos saber el número de ciclos en los que se realiza la transferencia en estadio de blastocisto. Los datos difieren mucho si hablamos de ciclos con ovocitos propios o de donante, siendo en el primer caso aproximadamente el 16% de las transferencias y el 50% con ovocitos donados.

ASEBIR: *Entonces, si dejar los embriones a estadio de blastocisto, es la opción que parece que mayores tasas de gestación ofrece, ¿por qué no todos lo hacen? ¿O es necesario individualizar cada caso?*

Irene: Efectivamente, tal y como dices, la transferencia en estadio de blastocisto es la que ofrece las mayores tasas de gestación con respecto a estadios más precoces del desarrollo embrionario. Por ejemplo, en transferencias de ovocitos propios, la tasa de gestación por transfer es del 28,5% en día 2, 34,8% en día 3 y 46,4% en estadio de blastocisto. Los datos hablan por sí mismos. Pero la realidad es que en la actualidad no todos los laboratorios están preparados para el cultivo sistemático hasta este estadio. Las condiciones deben ser las adecuadas para ello. Por ejemplo, es ya indiscutible que debemos trabajar a bajas presiones de oxígeno y en incubadores tipo *benchtop* donde las condiciones de cultivo son más estables incluso tras la apertura de cámaras, además de otros factores físico-químicos que debemos tener controlados como el pH de los medios de cultivo, la presencia de volátiles, etc... Es cierto que progresivamente se están introduciendo los cambios en los laboratorios, pero mientras no estemos seguros de nuestras condiciones de cultivo, me parece sensato seguir transfiriendo en estadios más precoces. En mi opinión, si confiamos en nuestro sistema de cultivo, lo más adecuado es el cultivo a blasto ya que al ofrecernos las mayores tasas de implantación embrionaria, podremos transferir un único embrión sin mermar nuestras tasas de embarazo.

Soy consciente de que muchos profesionales de la reproducción asistida ponen en duda el cultivo prolongado, por el miedo a no tener transferencia por bloqueo de todos los embriones. La experiencia en nuestro centro desde que adoptamos esta política de transferencia y vitrificación, nos ha demostrado que el número de cancelaciones por bloqueos es mínimo y los pacientes pueden asumir con más facilidad otras alternativas de tratamiento. Pero insisto en que la clave está en el cultivo.

ASEBIR: *Y dinos, Irene, como vocal del Registro de la SEF en Europa, ¿qué nivel científico y reproductivo tiene España con respecto a Europa?*

Irene: La verdad es que cuando presentamos los datos de España frente a los representantes europeos, igual que ocurre en las reuniones internacionales, siempre se genera gran expectación, ya que desde el año 2015, año en el que el Registro comenzó a ser obligatorio, nos pusimos a la cabeza europea en número de tratamientos. En cuanto al nivel científico, va a depender un poco con quién nos comparemos. Es cierto que la visión que tienen de nosotros fuera de nuestras fronteras es de líderes, no sólo en número de tratamientos, sino también en innovación y efectividad de los mismos. Pero nos queda mucho camino por recorrer, ya que si nos comparamos por ejemplo con los países nórdicos, nuestras tasas de gestación múltiple llegan a cuadruplicar sus cifras. Debemos mirarnos el ombligo en este sentido. Como comentaba antes, la transferencia en estadio de blastocisto nos está haciendo rebajar nuestra cifra de gestaciones múltiples, pero aún nos queda camino.

Otro aspecto que podríamos destacar es la infrautilización de la fecundación *in vitro* convencional con respecto a nuestros países vecinos.

En general estamos bien posicionados, pero no podemos relajarnos y debemos seguir trabajando para ser no sólo los que más tratamientos realizamos, sino los que ofrecemos tratamientos de mejor calidad y seguridad para nuestros pacientes.

ASEBIR: *Muchas gracias Irene, siempre es un placer hablar contigo. Vemos por aquí a Arantza y a M^a Carme, que tanto juego han dado con su exposición práctica de la clasificación de ASEBIR, ¿nos permitís un par de preguntas?*

Arantza: Por supuesto, estaremos encantadas de poder participar, como no.

ASEBIR: *Muchas gracias chicas. Pues contadnos un poco, y os vamos a poner en un poco de aprieto: la clasificación de ASEBIR con respecto a los blastocistos, ¿se ajusta a la realidad en los laboratorios?*

M^a Carme: La clasificación ASEBIR es muy útil para la valoración de los blastocistos pero, realmente, no se adapta a la perfección a la realidad de cada día. ¿Por qué? Por varias razones.

Porque no es tarea fácil elaborar una clasificación sencilla de aplicar en la que los cambios graduales que se producen en el estadio de blastocisto encajen en 4 categorías. De hecho, todas las clasificaciones que conocemos tienen características y limitaciones similares a la de ASEBIR. Además, como en otros tantos temas, el desarrollo de las herramientas de evaluación habitualmente avanzan más lentamente y como respuesta a las necesidades que demanda el trabajo diario en el laboratorio.

Arantza: De hecho, ha sido con la normalización del cultivo a blastocisto y con la tecnología *time-lapse* que nos hemos dado cuenta

que hay ciertas características o eventos que se observan con frecuencia en los blastocistos pero que la clasificación no contempla o no los define con precisión.

Justamente, uno de los objetivos de la sesión práctica que llevamos a cabo en cada edición del curso es detectar estas limitaciones y buscar puntos de mejora.

ASEBIR: *Así se consigue hacer ciencia de calidad, avanzando y adaptándose a los cambios. Y contadnos, si la tendencia de España es ir aumentando el cultivo hasta blastocisto, pero no todos lo hacen, ¿creéis que habría que readaptar la clasificación de Asebir, añadiendo por ejemplo material fotográfico o didáctico para eliminar la subjetividad entre centros y conseguir que más usuarios lo usen?*

Arantza: Sin duda la clasificación ASEBIR debe adecuarse a esta nueva situación. Por un lado, definiendo y valorando de la forma más objetiva posible los blastocistos y por el otro, como se apunta, ofreciendo material didáctico, imágenes, videos,... que nos familiarice con los blastocistos, ayude a reducir la variabilidad interindividual y permita consensuar criterios.

Mª Carme: Uno de los objetivos del GIE es la mejora de la clasificación con la máxima evidencia científica y para ello; próximamente vamos a realizar un ambicioso estudio multicéntrico. También estamos trabajando en la elaboración de un banco de imágenes y, por supuesto, seguimos con los cursos como un espacio de aprendizaje y de debate.

ASEBIR: *Muchas gracias por vuestro tiempo y por ayudarnos tanto hoy.*

Mª Carme / Arantza: Gracias a vosotros por lo fácil que habéis hecho esta colaboración y la gran aceptación que hemos tenido.

ASEBIR: *Tenemos aquí al mismísimo Alberto Tejera al que agradecemos enormemente su charla de hoy, ¿nos permite un par de preguntas aprovechando la ocasión y su charla?*

Alberto: Por supuesto, encantado de poder ser de ayuda en todo lo que necesitéis...

ASEBIR: *Alberto, queremos saber tu opinión acerca de los sistemas time-lapse y los blastocistos, dinos, ¿qué factores importantes tiene el time-lapse para clasificar un buen blastocisto?*

Hemos comprobado que el colapso espontáneo de los blastocistos (aproximadamente 20% de incidencia) es algo negativo para su implantación (al contrario de lo que se creía), observando un 10% menos de implantación de este comportamiento.

Por otro lado, en la descongelación de blastocistos, también hemos observado que tanto las zonas adelgazadas al desvitrificarlos (< 18 micras), el adelgazamiento de la zona justo antes de transferirlos (<11 micras) y unas mayores áreas post-descongelados (>9900 micras al cuadrado) y pre-transfer (>141597 micras cuadrado) son factores de buen pronóstico de cara a la implantación.

La reexpansión post-descongelación también conlleva una mayor implantación de los blastocistos, así como si lo hacen en menor tiempo (2.6 h vs 3.5h). También un mayor diámetro (tanto en fresco como post-descongelación) resulta relevante de cara a la implantación (< 164 micras 51.6% 165-182 micras 59.8% >183 micras 63.8%).

El diámetro de la masa celular interna también es un factor importante, de modo, que aquellas MCI con mayor área tienen mayor implantación que aquellas más pequeñas (<2147 51.60%; 2148-2640 59.80%; 2641-3221 63.80%).

ASEBIR: *Qué interesante, y en este sentido, ¿crees que es necesario, teniendo un incubador trigás y realizando el cultivo a blastocisto, implementar el time lapse en un laboratorio? ¿En qué nos puede ayudar?*

A pesar de tener un incubador trigas y realizar cultivo a blastocisto un sistema de time-lapse siempre nos va a aportar un plus de calidad cuando se implementa en un laboratorio de FIV.

A parte de todo lo anterior descrito, los sistemas de *time-lapse* son capaces de mejorar la selección embrionaria puesto que nos ayudan a detectar ciertos comportamientos que sabemos que afectan negativamente a la implantación: por ejemplo divisiones directas cc2 (t3-t2) y cc3 (t5-t3) o "reverse cleavage" que no somos capaces de detectarlas mediante la evaluación convencional, y que al ser detectadas por los sistemas de *time-lapse* permite descartarlos. Los últimos avances en este campo apuntan a una automatización de los sistemas de *time-lapse* para permitir seleccionar los embriones de manera más objetiva y eliminar subjetividad (que también hoy hemos podido corroborar) condicionando esta selección.

ASEBIR: *Muchísimas gracias Alberto, por tu tiempo y colaboración. Siempre es un placer hablar contigo.*

Alberto: Gracias a vosotros, que siempre nos tratáis tan bien y nos hacéis sentir tan agusto.

ASEBIR: *Parece que vemos a Joe en su momento de descanso. Good afternoon, Dr. Conaghan, It's a pleasure for us to have you here. Thanks you for coming today...*

Joe: Thanks you to invite to come here. Spain is a great country.

ASEBIR: *Could we ask you some questions?*

Joe: Ohh, of course.

ASEBIR: *If you know ASEBIR's classification, what significant differences are between ASEBIR's and the one you use in America?*

Joe: There are differences in grading between ASEBIR and the grading system in the USA.

For oocytes, we generally do not grade, but do record abnormalities just like ASEBIR. And we agree that the appearance of the cumulus/corona does not predict outcomes for oocytes. For cytoplasmic inclusions, we also have a lot of disagreement on their predictive value. We also worry about aggregates of smooth ER, but we still inseminate these oocytes (ASEBIR recommends no insemination). The only oocytes we discard are giant oocytes (agree with ASEBIR).

For Day 1, we also do not grade. We do not usually pay close attention to symmetry or location of pronuclei or nucleolar precursor bodies. We do not discard 1PN's (ASEBIR suggests discarding 1PN/2PB oocytes after ICSI).

We do not look at early cleavage. We do not score embryos on Day 2 but agree that 4-cell stage is best.

For Day 3 embryos there is still much debate on the number of blastomeres in the best embryos. Some embryologist think that 8 cells on D3 is still the best (similar to ASEBIR) but many embryologists think that > 8 cells is better. We agree with ASEBIR on the stage specific asymmetry, fragmentation and multi-nucleation of cells. But we would not downgrade an embryo that has an abnormal zona as we can do AH to correct that defect.

For Day 4, we agree with ASEBIR that this is the least studied stage and we do not do transfers or embryo assessments on D4.

In D5 embryos we describe the stage, and the quality of the trophectoderm (TE) and ICM, similar to ASEBIR. However we only have 3 categories for the TE and ICM (Good, Fair, Poor) compared to ASEBIR which has A, B, C and D. There are 4 stages for blastocysts (Early, Blastocyst, Expanded and Hatching). We use the same grading for D6 and D7 embryos.

ASEBIR: *Do you think that hatching is important to increase pregnancy rates?*

Joe: For fresh embryo transfers, the published literature shows no benefit from AH. However, for frozen embryo transfers we make very large openings in the ZP which are about 1/3 or 1/4 of the zona. We believe that this improves implantation potential for medium or poor quality blastocysts and it eliminates the cycles of collapsing and re-expanding that happen as blastocysts try to hatch.

ASEBIR: *Do you think that in the near future there will be a laboratory automatization? Is it positive?*

Joe: No, I think that automation is not going to happen for a long time. The work is too delicate and the embryos are so different from each other. We cannot agree on what parameters to use to predict embryo viability so it will be a long time before selection of embryo for transfer is automated. Also, procedures such as oocyte retrieval or embryo transfer will be very difficult to automate. There is a device that can automate vitrification but it is not widely used. For now, we don't trust the machines.

ASEBIR: *Do you have any experience in blastocyst culture untill day 7? What's your opinion on that?*

We culture all our patients to D7. We have been doing it for almost 5 years. The efficiency (babies born/embryos frozen) is very low. About 15% of all our frozen blastocysts are D7 embryos. But they have lower euploidy rates (35%) compared to D5 and D6 embryos (50%). They also have lower implantation rates (32% for D7 embryos and 55% for D6/6 embryos). After 5 years we only have 22 babies born from over 70 FET's. Each clinic must decide if they consider the time and effort to culture to D7 to be worth doing.

ASEBIR: *Thanks you for your time, Dr. Conaghan. You have been very kind.*

Joe: It's a pleasure to be here with you, thank you for inviting me.

ASEBIR: *Y por último y no menos importante, el hombre que ha conseguido una participación elevadísima en su encuesta lanzada a los socios para conocer el estado de ciertas técnicas en España, que ha prometido pasarnos para el uso de todos. Miquel, bienvenido a Valencia, gracias por estar aquí.*

Miquel: Muchísimas gracias, la verdad es que fue increíble ver como en relativamente poco tiempo, la gente se volcó a contestar la encuesta que ha permitido hoy presentar resultados de bastante peso...

ASEBIR: *Ya nos contarás el secreto...*

(Todos ríen).

ASEBIR: *Permítenos que nos aprovechemos de tenerte aquí... cuéntanos, ¿crees necesario un sistema de automatización en todos los centros, o sería eficiente solamente en los centros con gran volumen de trabajo?*

Miquel: Dependerá de las necesidades y resultados que tengan actualmente en el laboratorio. Si éstos no se ajustan a los estándares actuales, un equipo automático puede ser una incorporación necesaria. Pero, en general, las técnicas actuales han demostrado una gran solvencia tanto en ovocitos como en embriones sin que se haya podido demostrar una mayor eficacia de la automatización del proceso de vitrificación.

Sí creo firmemente que la tendencia en un futuro cercano será la de incorporar equipos automáticos que eviten las variaciones que se pueden dar entre diferentes procedimientos y operadores de vitrificación. Hoy por hoy, creo que puede tener mayor utilidad en centros pequeños en los que no se pueden alcanzar suficiente experiencia para tener personal altamente experimentado en la técnica. En los centros con mayor volumen, la amplia experiencia en la técnica de vitrificación manual puede hacer que sea más difícil mejorar la eficacia actual.

ASEBIR: *En tu experiencia con los sistemas automáticos, ¿has visto un aumento en la eficiencia o efectividad en la técnica y los resultados?*

Los resultados obtenidos en blastocistos biopsiados y en ovocitos son comparables. La eficacia dependerá de los protocolos actuales de cada centro ya que la automatización del proceso de vitrificación puede disminuir el tiempo de trabajo durante la vitrificación haciendo más rentable su uso.

ASEBIR: *Muchas gracias Miquel, no te entretenemos más, muchas gracias por tu colaboración y esperamos poder contar con esos resultados pronto.*

Miquel: ¡Eso está hecho! Muchas gracias por todo, ha sido un placer.

ASEBIR: *¿Foto de grupo?*



ASEBIR: *Gracias a todos. Habéis hecho del día de hoy, una auténtica gozada. Gracias.*

SITUACIÓN ACTUAL EMBRIÓLOGO CLÍNICO

Adjuntamos nota de prensa remitida a los medios de comunicación en el mes de diciembre del 2018, para hacer llegar a la población general los problemas existentes, ante la ausencia de regulación en nuestra profesión.

Mediante noticias y newsletters, iremos manteniendo la información actualizada para que podáis estar al día de todo lo que va ocurriendo.

CONVOCATORIA

Las leyes europeas obligan a incluir a los profesionales que trabajan en áreas como la Reproducción Humana Asistida, la Genética Clínica o la Microbiología en el Registro Estatal de Profesionales Sanitarios (REPS) antes de finales del año 2018.

Europa sancionará a España a partir del próximo año si no reconoce a los embriólogos como profesionales sanitarios

El Master en Biología y Tecnología de la Reproducción de la Universidad de Murcia celebra una mesa redonda en la que se abordará por primera vez esta problemática con la participación **del presidente de ASEBIR, Antonio Urries.**

Madrid, 29 de noviembre de 2018. En apenas un mes expira el plazo para que los cerca de 2.000 profesionales que se dedican en España a la Reproducción Humana Asistida sean incluidos en el Registro Estatal de Profesionales Sanitarios (REPS) como sucede en todos los países europeos.

España es el único país europeo que no reconoce como profesionales sanitarios a los embriólogos que desempeñan su función en el ámbito de la reproducción asistida y tratamientos en hospitales o centros sanitarios.

Esta falta de regulación **abre las puertas en nuestro país al desarrollo de la actividad por profesionales no cualificados**, a la vez que **pone en riesgo el puesto de trabajo de centenares de embriólogos españoles** que trabajan en otros países europeos donde ya se exige ese reconocimiento como profesionales sanitarios.

Esta problemática afecta a una especialidad que da respuesta no solo a los problemas de esterilidad e infertilidad sino a aspectos como el diagnóstico genético preimplantacional o la **selección embrionaria para el tratamiento de enfermedades de hermanos genéticamente compatibles** a los que la medicina actual no puede procurar una curación total.

Por ello, el **Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción de la Universidad de Murcia** ha organizado el **próximo 3 de diciembre** una Mesa redonda en la que **ASEBIR (Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción)**, el **Consejo General de Colegios Oficiales de Biología**, la **Consejería de Salud de la Región de Murcia** o el propio **Ministerio de Sanidad** entre otros organismos y Administraciones debatirán sobre **¿Cómo Trabajar como embriólogo clínico?** y La problemática del reconocimiento de los profesionales sanitarios.

ASUNTO: Mesa Redonda "¿Cómo trabajar como embriólogo clínico? y La problemática del reconocimiento de los profesionales sanitarios.

DÍA: Lunes, 3 de diciembre de 2018

HORA De 16:00 h a 20:00 h

LUGAR: Aula Magna, Facultad de Veterinaria (UNIVERSIDAD DE MURCIA). C/ Campus Universitario, 7, 30100 Murcia

Los que no pudieron asistir a la mesa redonda, todavía pueden ver las charlas en el siguiente enlace: <https://tv.um.es/v?123371>.

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

www.asebir.com

aniversario
1993-2018
25^o ASEBIR