

ASEBIR

EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

JUNIO 2017 **VOL. 22 N° 1**

- 5** IX CONGRESO DE ASEBIR
- 6** GI GENÉTICA, NUEVO REGISTRO DGP ASEBIR
- 11** VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN ESTADIO DE BLASTOCISTO Y D+3 EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA
- 17** ENFERMEDADES MITOCONDRIALES, FIV TRIPARENTAL
- 28** CONTROL DE CALIDAD EN UN LABORATORIO DE FIV
- 37** NOTICIAS
- 45** AGENDA

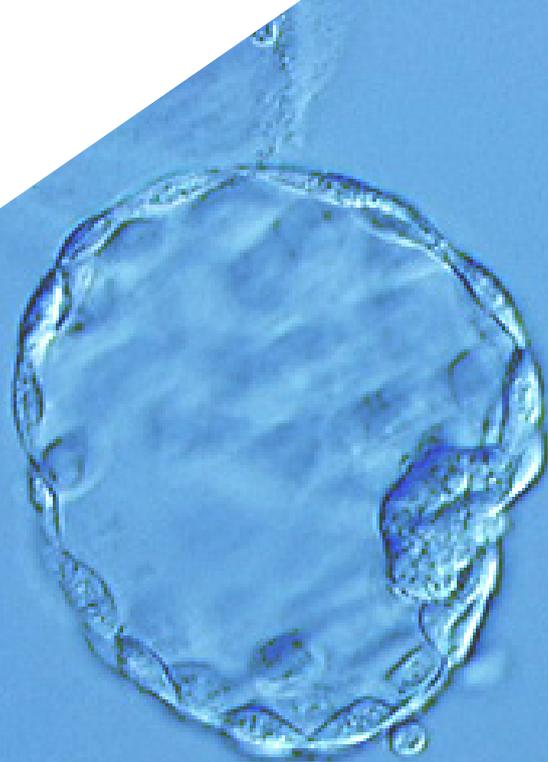


Imagen portada:

Imagen cedida por MD. Lozano Arana del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

SUMARIO

EDITORIAL5

IX Congreso de ASEBIR.
Montse Boada y Yolanda Minguez

Aspectos legales sobre los estudios genéticos de cribado de enfermedades recesivas en los programas de donación

ACTUALIDAD9

GI Genética. Registro de actividad en DGP.
Xavi Vendrell

AULA JOVEN 11

Ventajas e inconvenientes de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto y d+3 en la reproducción asistida.
Gabriela González Iglesias

Enfermedades mitocondriales. FIV triparental.
Elisa Alvarez Socias

FORMACIÓN CONTINUADA 28

Control de calidad en un laboratorio de FIV.
Beatriz Amorocho Llanos

NOTICIAS 37

Cuadernillo de Andrología. Contaminación ambiental y stress oxidativo.

¡Ya somos más de 1000!

Ganador Aula Joven.

ASEBIR, ahora también en Twitter y LinkedIn.

IX Congreso ASEBIR. Madrid 2017.

Bolsas de viaje para estancias en el extranjero.

Memoria del Trabajo de la Estancia en el Extranjero.

MEMORIA DEL TRABAJO DE LA ESTANCIA EN EL EXTRANJERO

42

AGENDA45

Agenda Formación Asebir 2017.

Junio 2017 Vol. 22 N°1

EDITA

Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

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

COMITÉ EDITORIAL

Presidente:

Dra. Montserrat Boada Palá. Institut Universitari Dexeus-
Barcelona

Vicepresidenta:

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

Secretaría y RRPP:

Dra. Anna Serra Peruchet. IBILAB-Illes Balears

Tesorería:

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

Patrocinios:

Dra. Aranzazu Galán Rivas. IVI Valencia-Valencia

Vocalía de Grupos de interés e investigación:

Dra. Laura Marqués Soler. Centre de Reproducio Asistida,
Clínica Sagrada Familia-Barcelona

Vocalía de Publicaciones y Congresos

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

Vocalía de Docencia y Formación

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

Vocalía Tecnología de la información y comunicación

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

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

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

Soporte válido: 78-R-CM

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.

IX CONGRESO DE ASEBIR - MADRID 2017



Montse Boada
Presidenta ASEBIR
2013-2017



Yolanda Mínguez
Presidenta Comité
Organizador

Estimados/as compañeros/as:

En nombre del Comité Organizador y de la Junta Directiva de ASEBIR, es un placer poder daros la bienvenida a nuestro IX Congreso de ASEBIR.

El proyecto de realizar este congreso en Madrid arrancó hace ya unos años. La idea, surgió por parte de un grupo de colegas que llevamos ejerciendo desde los inicios la Embriología Clínica y la Biología de la Reproducción, tanto en el sector público como privado de la Comunidad de Madrid.

La ilusión y el entusiasmo de todos ellos, junto a la inestimable colaboración de la actual Junta Directiva, nos ha permitido materializar aquella idea en el próximo IX Congreso ASEBIR Madrid 2017.

Como en ediciones anteriores, el Congreso ofrece un programa de alto nivel científico, estructurado en sesiones en torno a los cinco Grupos de Interés con los que cuenta la asociación: Andrología, Calidad, Criobiología, Embriología y Genética.

Contamos también con 5 Simposios Satélites con ponentes de reconocido prestigio y con 3 cursos pre-congresos que complementarán el interesante programa elaborado conjuntamente por el Comité Científico y la Junta Directiva.

En definitiva, se abordarán temas novedosos que no dudamos van a ser de interés para todos, incluidos los profesionales más jóvenes que se están iniciando en el apasionante campo de la actual Biología de la Reproducción.

Como novedad de este año se ha incorporado la posibilidad de enviar abstracts en inglés. Desde la Junta Directiva y el Comité Organizador hemos querido fomentar la introducción en nuestro congreso del idioma científico por excelencia, compromiso que adquirimos en la Asamblea General celebrada durante el último congreso. La presencia de ponentes extranjeros junto con la celebración del I Joint meeting ASEBIR&SIERR, son otras acciones previstas que van en la misma línea.

Coincidiendo con el congreso, se celebrará la quinta convocatoria del examen para la obtención de la "Certificación ASEBIR en Reproducción Humana Asistida. Embriología Clínica".

Un año más, contaremos también con los conocidos premios a la mejor comunicación y al mejor póster, seleccionados por el Comité Científico.

En el marco del Congreso, se renovarán los miembros del Comité Permanente de los Grupos de Interés, y también este año se renuevan los miembros de la Junta Directiva.

Agradecemos vuestra enorme participación, con 202 comunicaciones recibidas. Los resultados de vuestras experiencias e investigaciones, expuestos en las comunicaciones orales y en los posters, van a resultar sumamente enriquecedores para todos los asistentes.

Queremos agradecer también a todos los ponentes y moderadores que han aceptado nuestra invitación, a los organizadores, a la Secretaría Técnica de ASEBIR y a todos aquellos que con su apoyo hacen posible la celebración de nuestro congreso bienal.

Nuestros patrocinadores merecen un agradecimiento especial. Su constante compromiso hacia ASEBIR y su colaboración son imprescindibles para que nuestro congreso sea una realidad.

Madrid es una ciudad cosmopolita, acogedora, abierta, cordial y libre, donde nadie se siente extraño y todo el mundo es bienvenido.

¡Confiamos en que disfrutéis mucho durante vuestra estancia entre nosotros!



15.17 Noviembre 2017

Montserrat Boada
Presidenta ASEBIR 2013-2017

Yolanda Mínguez
Presidenta Comité Organizador

ASPECTOS LEGALES SOBRE LOS ESTUDIOS GENÉTICOS DE CRIBADO DE ENFERMEDADES RECESIVAS EN LOS PROGRAMAS DE DONACIÓN

Montse Boada, Xavier Vendrell, Inmaculada Campos, Arancha Galán, Abel Gayo, Laura Marqués, Enrique Olaya, José Luis de Pablo, Josep Santaló, Anna Serra, M^a José Torelló.

Junta Directiva de ASEBIR (2013-2017)

El conocimiento del estatus genético en relación con las enfermedades recesivas, o recesivas ligadas al cromosoma X, es muy importante desde el punto de vista anticipatorio, en el contexto del asesoramiento preconcepcional. En este sentido, los estudios genéticos dirigidos a establecer la condición de portador/a, o no portador/a, de enfermedades hereditarias, han aparecido recientemente y de forma rotunda en el ámbito de la biomedicina reproductiva. Si bien pueden aplicarse en distintas situaciones, estos estudios cobran una especial relevancia en los programas de donación de gametos.

El continuo y rápido avance que se está produciendo en los métodos de diagnóstico genético ha permitido que estos estudios sean cada vez más precisos y amplios, pudiéndose analizar un gran número de enfermedades en un mismo ensayo.

El presente escenario ha propiciado la aparición de un gran debate acerca de la regulación, pertinencia, e incluso alcance, de estos estudios genéticos. El presente documento pretende establecer el posicionamiento actual de ASEBIR para que pueda servir de guía en aquellas cuestiones que de forma más recurrente plantean dudas.

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA EL CRIBADO DE ENFERMEDADES RECESIVAS A LOS/LAS DONANTES

Ni la ley de reproducción 24/2006 ni el Real Decreto ley 9/2014, sobre calidad y seguridad de las donaciones, imponen la realización de ningún tipo de prueba genética concreta, ni a los donantes, ni a las parejas receptoras. Por lo tanto, en el momento actual no es obligatorio hacer pruebas de emparejamiento genético (matching genético), pues no existe ninguna norma que así lo indique, ni dichas pruebas están incorporadas a las guías clínicas del Sistema Nacional de Salud.

No obstante, el Real Decreto ley 9/2014 indica que, en las donaciones de células reproductoras fuera de la pareja, se realizará una evaluación de la carga genética en relación a los genes autosómicos recesivos, de acuerdo al conocimiento científico y a la etnia del donante, así como una evaluación del riesgo de enfermedades hereditarias conocidas y presentes en la familia. En consecuencia, a partir de la entrevista clínica, habrá que valorar qué pruebas genéticas procede realizar, en su caso.

Así mismo y teniendo en cuenta que el Artículo 5.6 de la Ley 14/2006 especifica que *El estado psicofísico del donante deberá cumplir las exigencias de un protocolo obligatorio de estudio de los donantes que incluirá sus características fenotípicas y psicológicas, así como las condiciones clínicas y determinaciones analíticas necesarias para demostrar, según el estado de los conocimientos de la ciencia y de la técnica existentes en el momento de su realización, que los donantes no padecen enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles a la descendencia y debido a la existencia de estudios para la realización de cribado genético*, los pacientes deben ser informados de la existencia de estos estudios genéticos y valorar, en cada caso, su realización tanto al donante como al receptor. Algo parecido sucedió con el cariotipo que, si bien la normativa vigente no obliga a realizarlo, con el tiempo y de acuerdo a las recomendaciones de las sociedades científicas, mayoritariamente se ha terminado aceptando su necesaria realización, tanto a donantes como a receptores, previamente a cualquier TRA.

DONANTES PORTADORES/AS DE UNA ENFERMEDAD GENÉTICA CONOCIDA

Desde el punto de vista asistencial se considera que la mayoría de personas son portadoras de alguna mutación en alguno de los genes que se estudian y que, si se trata de un gen con herencia mendeliana autosómica recesiva, solo hay que hacer el matching con otra persona que no sea portadora de ninguna mutación en el mismo gen. Se desaconseja descartar a los/as donantes por ser portadores pues su condición de portadores/as es algo considerado "normal" en la población. En las donaciones de ovocitos, lo que se debe hacer es estudiar al marido/pareja masculina de la receptora de ovocitos y confirmar que no tiene ninguna mutación en el mismo gen. Si fuera así, se buscaría otra donante pero no se descartaría.

Distinto es cuando una donante es portadora de una mutación ligada al cromosoma X porque en este caso el riesgo de transmisión de la enfermedad a la descendencia es alto y no puede evitarse si se trata de un hijo varón y en determinados casos, también si es de sexo femenino. Estos casos son considerados de alto riesgo reproductivo (a diferencia de las formas autosómicas recesivas) y sí deberían ser descartadas y ofrecer un adecuado asesoramiento genético a todas/os las donantes.

NECESIDAD DE ESTUDIO DE LA PAREJA DEL RECEPTOR/RA

La aparición de los estudios genéticos para el cribado de portadores es muy reciente, por lo que no existe en el momento actual ninguna norma que lo regule. En consecuencia, no podemos afirmar que sea obligatorio realizar el estudio a la pareja, aunque teniendo en cuenta los trabajos publicados hasta el momento, cuando se haya realizado el cribado a el/la donante y siempre que el equipo médico lo estime conveniente, parecería recomendada su realización, para proceder a un matching correcto (evitando la coincidencia de dos portadores de mutaciones en un mismo gen) y evitar descartar donantes únicamente por su condición de portador, lo que éticamente podría considerarse reprochable.

COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO GENÉTICO

El artículo 5 de la Ley 14/2006 dice textualmente que la donación será anónima y deberá garantizarse la confidencialidad de los datos de identidad de los donantes pero también afirma que las receptoras de gametos y de los embriones así como los hijos nacidos o sus representantes legales tienen derecho a obtener información general de los donantes que no incluya su identidad ya que esta solo podría revelarse en circunstancias excepcionales.

En el artículo 18.3 de la misma ley, se puntualiza que los datos de la historia clínica, excepto la identidad de los donantes, deberán ser puestos a disposición de la receptora y de su pareja, o del hijo nacido por estas técnicas o de sus representantes legales cuando llegue a mayoría de edad, si así lo solicitan. Por tanto, es recomendable informar de que se dispone de la información del perfil genético y, si se solicita, podrá informarse de aquello que tenga trascendencia clínica para los receptores y su descendencia.

Posicionamiento de ASEBIR Consensuado en la Reunión de la Junta Directiva de ASEBIR celebrada el 19 de Mayo de 2016.

Nuevos microinyectores para un control muy preciso de sus muestras

Desde que en 1996 Eppendorf sacara al mercado sus modelos de CellTram® Air, Oil y Vario, muchas clínicas de reproducción tanto del ámbito público, como del privado, han confiado en estos microinyectores para realizar la técnica de Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

El extraordinario poder de sujeción del CellTram Air con sistema sin aceite y la eficacia de un sistema hidráulico de aceite para una perfecta aspiración y dispensación de los espermatozoides del CellTram Oil, añadido a la presencia de un segundo botón micrométrico para poder realizar biopsias para Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGD) del CellTram Vario, son algunas de las características que han hecho que estos microinyectores sean una referencia en los laboratorios de Fecundación *in vitro* (FIV).

Este año 2017, Eppendorf lanza los nuevos microinyectores CellTram 4 Air/Oil, donde en ambos modelos se incorporan dos botones giratorios de accionamiento dual grueso/fino, y que en el caso del nuevo CellTram Oil, permite realizar las mismas funciones que el antiguo CellTram vario, que desaparece como tal.

Con los nuevos CellTram 4 Air y Oil, el embriólogo podrá configurar su estación de micromanipulación con microinyectores de aire o aceite tanto en el lado de sujeción, como en el de inyección/biopsia. De esta manera, podrá declinarse por un sistema de aire totalmente libre de acei-



El nuevo CellTram Oil incorpora los dos botones giratorios greso/fino del antiguo CellTram Vario, permitiendo realizar las mismas funciones que este.

te o por un sistema hidráulico con aceite donde, se mejora también el sistema de llenado, minimizando los derrames y el tiempo empleado en el proceso.

Ambos modelos han sido diseñados con especial énfasis para obtener una ergonomía excelente, facilidad de uso y máxima precisión.

Además, los CellTram 4m Air y Oil están registrados como dispositivos médicos (de acuerdo con la Directiva 93/42/CEE relativa a productos sanitarios).

Contacte con nosotros:
eppendorf@eppendorf.es
www.eppendorf.com



ACTIVIDAD ASISTENCIAL EN DGP: EL NUEVO REGISTRO DGP-ASEBIR.

GI Genética

Xavier Vendrell

Presidente del Grupo de Interés de Genética y Reproducción (GiGR)



El diagnóstico genético preimplantación (DGP) es una de las formas de diagnóstico genético más precoces que existen. Constituye uno de los ejemplos más claros de trabajo multidisciplinar, en el que cada actor tiene una importancia capital para el éxito del proceso. Intervienen expertos en áreas tremendamente distintas: la medicina reproductiva, la embriología y la genética. En los últimos años, el DGP está cobrando un protagonismo especial gracias a los avances a los que estamos asistiendo en todas las áreas. En especial, la modalidad de cribado cromosómico, el conocido como PGS (*preimplantation genetics screening*), CCS (*comprehensive chromosome screening*) o estudio de "24 cromosomas", se está consolidando como uno de los principales criterios de selección embrionaria, simultáneamente a otros desarrollos que tienen lugar en los laboratorios de fecundación *in vitro*. Por otro lado, el DGP estricto en casos de enfermedades monogénicas, incorpora un elemento crucial: la anticipación. En este sentido, el DGP se ha convertido en una de las opciones reproductivas más atractivas para las parejas con riesgo genético, que pretenden evitar la transmisión de una determinada enfermedad hereditaria, cumpliendo con uno de los principios clave de la biomedicina preventiva.

En este escenario el conocimiento profundo de las técnicas diagnósticas, las indicaciones clínicas, las enfermedades susceptibles de aplicar el DGP y los resultados clínicos, resultan imprescindibles para poder conocer la evolución del proceso de DGP y poder intervenir en su desarrollo futuro. En este punto, el registro de actividad es especialmente necesario. Con esta intención, entre muchas otras inquietudes,

en octubre del año 2011 en Murcia se creó el grupo de interés en DGP, en el seno del primer Congreso de ASEBIR, predecesor del actual grupo de interés en genética y reproducción (GiGR). Una de las primeras acciones consistió en elaborar un registro de casos de DGP. El primer registro fue publicado en el año 2005 y recogía los datos de los diagnósticos realizados desde abril del 1993 hasta aquel momento. El GiGR ha ido manteniendo una actividad constante relacionada con el seguimiento del proceso asistencial del DGP en España, creando y manteniendo actualizado el Registro DGP-ASEBIR. Desde entonces, el registro tiene una naturaleza voluntaria y una periodicidad anual, siendo la última información recopilada la que recoge los datos de los ciclos de DGP realizados durante los años 2012/2013. Este hecho ha permitido consolidar el registro de DGP de ASEBIR como la recogida de datos más exhaustiva existente en la actualidad en este campo.

Por otro lado, la modificación introducida en la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, con la incorporación de la disposición adicional sexta, exige a todos los centros de Reproducción Humana Asistida españoles, a través de las comunidades autónomas, que participen de forma obligatoria en el Registro de Actividad (Disposición final primera de la Ley 18/2015, de 9 de julio, por la que se modifica la Ley 37/2007, de 16 de noviembre, sobre reutilización de la información del sector público). Este hecho ha propiciado que el registro de DGP de ASEBIR resulte de especial interés para las Autoridades Sanitarias. En este sentido, el GiGR a petición de la Junta Directiva elaboró un informe que recogía los datos del registro referente a la actividad asistencial de los centros de españoles en el contexto del DGP de enfermedades monogénicas y casos de DGP en combinación con la determinación del genotipado HLA con fines terapéuticos para terceros (DGP-HLA). Este informe está disponible en la web de ASEBIR: <http://asebir.com/grupos-de-interes/grupo-de-interes-de-genetica-y-reproduccion>, y su lectura resulta muy útil para contextualizar la situación del DGP.

Debido al interés suscitado por el registro de DGP, así como la necesidad de optimizar la recogida de datos, la Junta Directiva y el GiGR han apostado por una importante actualización del sistema de recogida de datos del registro, de forma que sea más ágil y exhaustiva. El método actual cuenta con serias limitaciones, la recogida de los datos se realiza mediante un cuestionario voluntario, enviado por correo electrónico a los centros que deciden participar. La convocatoria se realiza a través de la lista de correo de ASEBIR, por parte de nuestra secretaría técnica. Los centros participantes cumplimentan los campos prediseñados en una hoja de cálculo y la devuelven a la secretaría, en un plazo determinado. Posteriormente, los datos se remiten al GiGR de ASEBIR, que procede al análisis de los resultados y a su publicación. La idea es informatizar la recogida y análisis de los datos, y poder incluir en los futuros informes, datos relativos a todas las indicaciones de DGP así como a la evolución de los ciclos. Con este objetivo, la Administración del Estado ha decidido apoyar económicamente este proyecto y, con fondos adicionales de ASEBIR, se está diseñando una aplicación informática, que permitirá la creación del primer registro *online* de DGP. Esto abre una línea de trabajo intensa y con intención de continuidad. En el futuro próximo se pretende mostrar la aplicación a todos los socios, conseguir el mayor grado de participación en el registro e intentar que el Registro de DGP-ASEBIR se convierta en el registro oficial de esta actividad.

Desde el GiGR y la Junta Directiva de ASEBIR somos conscientes de la envergadura del proyecto, pero sabemos que este tipo de acciones son necesarias para conocer en profundidad la realidad de un proceso diagnóstico tan complejo como es el DGP. Los cambios en este campo son exponenciales, y los desarrollos tecnológicos superan la capacidad de actualización de los prescriptores de este tipo de estudios. Muy probablemente, el conocimiento y control del proceso nos pueda ayudar a generar masa crítica y a una composición más exacta del escenario real del DGP.

Nº Registro DGSFP: J-1, 281. Concertado Seguro de R.C. y de Caución conforme a la Ley 26/2006



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



SI ERES DE ASEBIR, TU NUEVO SEGURO DE COCHE* TE CUESTA 100 € MENOS.

Contrata ahora y ahórrate **100 € en tu seguro de coche**, en la modalidad de **todo riesgo con franquicia**, solo por ser de ASEBIR. Y, además, disfruta de **importantes descuentos en otras modalidades de coche**, y en los **seguros de moto, comercios, hogar y comercios + hogar**.

Llama ahora y aprovecha esta promoción exclusiva para ti y tus familiares directos.

913 278 992
www.zurich.es/colegiosprofesionales



RESERVADO PARA ASEBIR



100 €
DE REGALO*



*Promoción válida para nuevas contrataciones (realizadas entre el 1 de febrero de 2017 y el 31 de diciembre de 2017) de póliza de Auto (turismos o furgonetas de uso particular) con la modalidad de todo riesgo con franquicia con pago anual y con tomador, conductor y/o propietario con al menos 5 años de carné. Para la mecánica y demás condiciones, y promociones para otras modalidades/productos, consulta las bases en <http://colectivos.zurich.es/colegiosprof/promociones>. Importe máximo por tomador: 250 euros, con independencia de las pólizas contratadas/modalidad. 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.

VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN ESTADIO DE BLASTOCISTO Y D+3 EN LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF THE TRANSFER OF EMBRYOS IN BLASTOCYST STAGE AND D+3 IN ASSISTED REPRODUCTION

Gabriela González Iglesias
embriogabriela@gmail.com

Resumen: Este trabajo se basa en comparar las ventajas e inconvenientes de la transferencia de embriones en estadio de división en día 3 (D+3) y de blastocisto en la reproducción asistida. Saber cuál es el estadio más adecuado para realizar la transferencia embrionaria, nos permitirá mejorar las tasas de embarazo y de recién nacido vivo. Valorando las ventajas y desventajas de cada estadio, se llega a la conclusión de que las tasas de embarazo son mayores con la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto que las obtenidas en la transferencia embrionaria en estadio de división D+3. El aumento de la tasa de embarazo, la tasa de implantación, la tasa de parto y de recién nacidos vivos es mayor. El estadio de blastocisto es el estadio más recomendado para la transferencia embrionaria.

Palabras clave: reproducción, blastocisto, estadio de división, tasa de embarazo, implantación, parto y recién nacidos vivos.

Summary: This work is based on comparing the advantages and disadvantages of transfer of embryo stage in day 3 (D+3) and blastocyst in assisted reproduction. Having the knowledge regarding at what stage is right for the time of embryo transfer will enable us to improve rates of pregnancy and successful births. It will assess the pros and cons of each stage, coming to the conclusion that pregnancy rates are higher with embryo transfer in the blastocyst stage, than embryo transfer obtained in D+3. The increase in pregnancy rate, implantation rate, birth rate and live births is higher. The blastocyst stage is the most recommended embryo transfer stage.

Keywords: reproduction, blastocyst, cleavage stage, pregnancy rate, implantation rate, delivery rate and newborns alive rate.

INTRODUCCIÓN

Desde el nacimiento de la Reproducción Asistida, el esfuerzo de todos los laboratorios se ha centrado en la obtención del embrión más viable para conseguir el nacimiento de un niño sano y por eso, numerosos autores han realizado una serie de estudios donde comparan las ventajas y desventajas que se obtienen al transferir embriones en día 3 (D+3) versus embriones en estadio de blastocisto.

Una correcta evaluación de la calidad embrionaria es determinante para lograr el éxito de un programa de fecundación *in vitro* (FIV). En la mayoría de clínicas de Reproducción Asistida, esta valoración se basa principalmente en los criterios de evaluación morfológica de los embriones obtenidos. Los embriólogos deben ser capaces de relacionar las características

que van observando, con el potencial de implantación de cada uno de los embriones en sus distintos estadios de desarrollo. Aunque estudios recientes basados en la captación de imágenes a tiempo real ("time lapse") a través de un incubador, indican que el tiempo entre cada una de las divisiones también es relevante (Rodríguez *et al.*, 2013).

Los blastómeros de los embriones tras llegar al estadio de 8 células en día tres, comienzan a mostrar adhesión entre ellos debido al aumento de las uniones intercelulares, concretamente de "tight junctions". En el cuarto día de desarrollo, empieza el inicio de la compactación, en este momento el embrión adquiere una morfología que hace que se denomine mórula. En el quinto día de desarrollo, tras la compactación celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele y se produce la diferenciación

celular, se diferencian las células del trofoectodermo que darán lugar a la placenta y las células de la masa celular interna (MCI) que dará lugar al feto. Esta nueva morfología embrionaria recibe el nombre de blastocisto (Arteaga M, García MI, 2014). Los parámetros morfológicos de clasificación se basan en el grado de expansión del blastocele, tamaño, forma y grado de compactación de la MCI y estructura y número de células del trofoectodermo. Los blastocistos con una gradación óptima para estos tres parámetros muestran las mejores tasas de implantación. El tiempo y el grado de expansión del blastocisto, también han sido identificados como importantes reveladores de la implantación (Rodríguez *et al.*, 2013).

No todos los embriones son capaces de llegar a la fase de blastocisto, está descrito que entre el 40 % y el 60 %

de los ovocitos fecundados *in vitro* alcanzan este estadio, y esta capacidad está directamente relacionada con la morfología que presenta el embrión en estadios más tempranos. Se han sugerido ciertos factores clínicos relacionados con altas tasas de blastulación, como por ejemplo mujeres jóvenes, con paridad previa, la utilización de la FIV convencional y la administración de bajas dosis de gonadotrofinas en la estimulación ovárica (Thomas *et al.*, 2010). La mayoría de los embriones que tienen un desarrollo correcto alcanzan la fase de blastocisto el quinto día de desarrollo (112-120 horas post inseminación), pero algunos muestran un desarrollo más lento, diferenciándose el sexto día (136-140 horas post inseminación). La tasa de implantación de estos embriones es inferior, pero no despreciable (Seli *et al.*, 2004).

En cuanto a la tasa de gestación múltiple tras un tratamiento de fecundación *in vitro* en Europa es del 21,7 % comparado con el 1,1 % de la concepción natural (Nyboe-Andersen *et al.*, 2008). La transferencia electiva de un único embrión para un grupo de pacientes determinado ha pasado a ser una práctica habitual en varias clínicas de todo el mundo, dados los efectos adversos que conllevan las gestaciones múltiples, como el aumento de la morbilidad perinatal y la mortalidad, las complicaciones obstétricas y el elevado coste sanitario. La principal razón para transferir 2 o 3 embriones es la percepción de que aumentando el número de embriones se conseguirán mejores resultados. Está demostrado que la transferencia de más de un embrión da lugar a una mayor tasa de implantación (Pandian *et al.*, 2005), pero como consecuencia, tiene muchas complicaciones obstétricas y perinatales (Kissin *et al.*, 2005), de modo que la importancia de seleccionar el embrión más viable para transferir ha intensificado los esfuerzos para mejorar las técnicas actuales de selección (Rodríguez *et al.*, 2013).

El objetivo principal de este trabajo es comparar las ventajas e inconvenientes de la transferencia de embriones en estadio D+3 y de blastocisto en la reproducción asistida. Saber qué

estadio es el adecuado para realizar la transferencia embrionaria nos permitirá aumentar la calidad de los resultados del éxito reproductivo, esto es, mejorar las tasas de implantación y las tasas de embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en PubMed-NCBI, ScienceDirect (Elsevier), Scope (Elsevier) y Google Académico (Google) usando palabras clave como "reproduction", "blastocyst", "cleavage stage", "pregnancy rate", "implantation rate", "delivery rate" and "newborns alive rate".

La finalidad fue conocer las bases teóricas que describen los dos estadios en los cuales se procede a realizar la transferencia embrionaria, así como reunir y analizar las evidencias a favor y en contra de la transferencia en los diferentes estadios embrionarios, para poder saber cual es más prometedor, para lograr un embarazo y por lo tanto, un recién nacido vivo en casa. Por ello, se establecieron los siguientes criterios de inclusión para los trabajos encontrados: estudios que mostraran tasas de embarazo, implantación parto y recién nacidos vivos.

RESULTADOS

1. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN ESTADIO DE BLASTOCISTO

1.1 Ventajas

Las ventajas que supone la transferencia de embriones en estadio de blastocisto son:

- El aumento de la tasa de embarazo, de la tasa de implantación, de la tasa de parto y de recién nacidos vivos (Blake *et al.*, 2005).
- La disminución del número de embriones a transferir y por lo tanto también menor riesgo de embarazos múltiples. La tasa de embarazo ectópico también puede estar disminuida (Kissin *et al.*, 2005).
- La tasa de contracciones uterinas en el momento de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto es menor, por la progresión de la fase lútea (Kissin *et al.*, 2005).

- Hay mayor sincronía entre embrión y endometrio, porque el embrión desciende a la cavidad uterina a partir del día 4 o 5 en condiciones *in vivo* (Guerif *et al.*, 2009).
- Facilita la selección de embriones a transferir tanto al embriólogo como al clínico, y los sobrantes a criopreservar (Blake *et al.*, 2005).
- El estadio de blastocisto es el estadio embrionario más recomendado para transferir en ciclos de donación de ovocitos y permite la selección de embriones con mayor potencial de desarrollo (Blake *et al.*, 2005).
- Los blastocistos tienen mejor correlación entre la morfología y el estado euploide, por lo tanto menor riesgo de aneuploidías (Blake *et al.*, 2005).

1.2 Desventajas

Las desventajas que supone la transferencia de embriones en estadio de blastocisto son:

- La incertidumbre de si el embrión llega a estadio de blastocisto y en consecuencia, el riesgo de cancelar transferencias que es mayor (Blake *et al.*, 2005).
- Las mujeres con fallos múltiples de FIV, con una disminución de la reserva ovárica y mala calidad de embriones, tienen muy poco beneficio con la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto (Blake *et al.*, 2005).
- Llevar el embrión hasta el estadio de blastocisto aumenta el costo y podría haber posibles efectos negativos de los medios de cultivo sobre el niño, como por ejemplo cambios en la expresión génica y alteraciones epigenéticas (Staessen *et al.*, 2004).
- Hay una mayor incidencia de gemelos monocigotos (Blake *et al.*, 2005).

2. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN ESTADIO DE D+3

2.1 Ventajas

Las ventajas que supone la transferencia de embriones en día 3 son:

- Aumenta la tasa de embarazo en bajas respondedoras (Blake *et al.*, 2005).

- Menos cancelaciones de ciclos, menor costo económico y menor tiempo de cultivo (Kissin *et al.*, 2005).
- Mejor pronóstico en pacientes con embriones que poseen un desarrollo lento y un número bajo de cigotos (Kissin *et al.*, 2005).

2.2 Desventajas

- La principal desventaja de la transferencia de embriones en día 3, es que los criterios morfológicos que regirán la selección es muy subjetiva y refleja con menos exactitud la calidad génica (Staessen *et al.*, 2004), por lo tanto, es más difícil de seleccionar el embrión más competente y de mejor calidad (Kissin *et al.*, 2005).
- La tasa de embarazo, de implantación, de parto y de recién nacidos vivos es menor (Blake *et al.*, 2005).
- Aumenta el número de embriones a transferir y por tanto, aumenta el riesgo de embarazos múltiples (Kissin *et al.*, 2005).
- Las contracciones uterinas son más frecuentes en D+3 aumentando el riesgo de un embarazo ectópico (Guerif *et al.*, 2009).
- La transferencia de embriones en D+3 tiene también la desventaja de que embrión y endometrio interactúan con mayor antelación de lo normal, pudiendo verse afectada su capacidad de implantación (Guerif *et al.*, 2009).
- En este estadio también hay mayor riesgo de aneuploidías (Blake *et al.*, 2005).
- Transferir un embrión antes de que se active su genoma, es transferir en la etapa más crítica de su desarrollo, disminuyendo así la probabilidad de implantación (Blake *et al.*, 2005).

3. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN ESTADIO DE D+4

Existe un estudio realizado por Deanne Feil y colaboradores en el 2008, en el que se promueve la transferencia de embriones en día 4 (D+4), ya que refiere que posee también ventajas en comparación de transferirlo en D+3 o en estadio de blastocisto. Entre las ventajas propuestas se aclara que en D+4 el embrión desciende a la cavidad uterina, el ambiente donde

normalmente reside, por lo tanto antes de la implantación, permanece mayor tiempo en el ambiente uterino y menor tiempo en el entorno *in vitro*, lo cual aumenta la tasa de implantación y también en ese momento, hay una reducción de la contractibilidad uterina (Blake *et al.*, 2005).

Los embriones en D+4 se transfieren después de la activación de su genoma, por lo tanto, se puede seleccionar el que tiene mayor potencial de desarrollo en una cohorte (Feil *et al.*, 2008).

DISCUSIÓN

Existen diferencias en el éxito reproductivo en función del momento de la transferencia embrionaria como se ven reflejados en los resultados de la publicación de Guerif y colaboradores en el 2009, siendo evidente la mayor tasa de implantación asociada a la transferencia en blastocisto (Guerif *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Papanikolaou afirma que la probabilidad de recién nacido vivo después de la FIV, es significativamente más alta en la transferencia en estadio de blastocisto comparando con la transferencia de embriones en estadio de división (D+3) (Papanikolaou *et al.*, 2008). También se encuentra una mayor tasa de gestación transfiriendo en estadio de blastocisto, del orden 42,3 % comparado con embriones D+3 que es del 32,4 % y la tasa de bebé sano con transferencia de embriones en estadio de blastocisto es del 27,4 % comparado con embriones D+3 que es del 18 % (Wang *et al.*, 2010). Aunque un meta-análisis realizado por Cochrane no encontró diferencias significativas en las tasas de recién nacido vivo o resultados de embarazo entre las transferencias de embriones en los días 2-3 y 5-6 (Blake *et al.*, 2005).

Se ha comprobado que la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto expandido en día 6 se relaciona con peores tasas de embarazo que la transferencia en día 5, sugiriendo una menor viabilidad de los embriones con un desarrollo más lento o una menor sincronía endometrial. Para evitar transferencias en día 6 sería conveniente transferir el embrión más evolucionado en día 5, aunque no esté expandido (Rodríguez *et al.*, 2013).

Hay estudios que muestran un menor porcentaje de aborto con las transferencias en blastocisto, ya que el embrión escogido para transferir viene de una cohorte de embriones de día 3 que ha pasado por un proceso de selección hasta día 5, de manera que muestran una mayor capacidad de implantación y menos posibilidad de finalizar en aborto. La disminución en el porcentaje de abortos con transferencias en día 5, no solo está relacionada con una mejor selección del embrión, sino que también juega un rol importante la receptividad uterina (Rodríguez *et al.*, 2013). Parece ser que los embriones que se transfieren en D+3 se encuentran expuestos prematuramente en la cavidad uterina, y esta asincronía puede dar lugar a una menor tasa de implantación o abortos tempranos. De igual modo, la transferencia en estadio de blastocisto presenta una mayor sincronización a nivel endometrial, ya que *in vivo* los embriones alcanzan la cavidad endometrial cuando comienza la compactación. Cuando se transfieren el mismo número de embriones en D+3 y en estadio de blastocisto, se observa un mayor potencial de implantación en blastocisto (Rodríguez *et al.*, 2013). En consecuencia, la transferencia de un único embrión sería más conveniente realizarla en estadio de blastocisto, ya que estos poseen una mayor capacidad de implantación (Practice Committee of the SART, Practice Committee of the ASRM, 2012).

En pacientes menores de 35 años con al menos cuatro embriones de buena calidad en D+3 y en casos donde se obtienen valores superiores a 3000pg/ml de estradiol, la transferencia se hace en estadio de blastocisto, mejorando las tasas de embarazo y recién nacido vivo. Valores superiores a 4200pg/ml de estradiol se han identificado como el umbral a partir del cual disminuye drásticamente la tasa de embarazo (Rodríguez *et al.*, 2013). También se han reportado datos que dan como valores de corte niveles superiores a 1,5ng/ml de progesterona, a partir de los que observamos una notable disminución de las tasas de embarazo en pacientes con transferencia en D+3. Esta disminución en las tasas de gestación no se observa en aquellas pacientes que se transfieren en estadio de blastocisto (Rodríguez *et*

al., 2013). Estos resultados sugieren que en el quinto día lúteo, el endometrio se ha recuperado del impacto de las concentraciones suprafisiológicas de hormonas esteroideas a las que se ha visto expuesto. De manera que en casos donde se obtenga una elevada concentración de estradiol, en combinación con la elevación prematura de la progesterona, la transferencia en blastocisto resultaría beneficiosa, compensando los efectos adversos sobre la receptividad endometrial (Elgindy *et al.*, 2011).

La evaluación morfológica de los embriones es subjetiva, la selección del embrión con la mejor calidad en D+3 no nos asegura que este sea normal cromosómicamente. Se ha demostrado que una notable proporción de embriones morfológicamente normales en D+3 son cromosómicamente anormales, contribuyendo en la pérdida de la implantación posterior. Aunque algunos embriones genéticamente anormales son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto, el riesgo de presentar aneuploidías es menor en blastocistos que en embriones más tempranos (Staessen *et al.*, 2004). Hasta el 60% de los embriones de buena calidad que están en estadio de división en D+3 pueden llegar a ser aneuploides, mientras que el 30% de los embriones de buena calidad en estadio de blastocisto son aneuploides (Staessen *et al.*, 2004).

Cultivar los embriones hasta blastocisto, donde el genoma embrionario se ha activado completamente, nos permite hacer una selección más precisa, esto es porque en el paso a la activación de su propio genoma, hay muchos embriones que se bloquean. De esta forma se va haciendo una selección, descartando los ya bloqueados (Rodríguez *et al.*, 2013). Prolongando el cultivo tiene lugar una selección natural que permite reducir el número de embriones anormales (Wang *et al.*, 2010). La activación del genoma embrionario tiene lugar cuando el embrión tiene alrededor de 8 células. El nivel de transcripción es mínimo durante las primeras divisiones celulares, utilizándose el conjunto de proteínas y RNAm que ha almacenado

el ovocito maduro. Un retraso del desarrollo embrionario puede relacionarse con una disminución de los niveles de RNAm, de manera que un correcto desarrollo hasta blastocisto se relaciona con una correcta transición materno-cigótica (Arteaga M, García MI, 2014).

En cuanto a la fragmentación de ADN, los embriones con más de un 15 % de fragmentación únicamente dan un 16,5 % de buenos blastocistos, y con menos de un 15 % de fragmentación, obtenemos un 33,3 % de buenos blastocistos (Alikhani *et al.*, 2000).

También se ha sugerido un posible efecto paterno en el desarrollo preimplantacional y en la formación del blastocisto. Pacientes con seminogramas normales tienen mayores tasas de formación de blastocisto que aquellos con parámetros alterados. El ensayo TUNEL en espermatozoides, que detecta roturas en el DNA, muestra la correlación negativa entre la fragmentación del DNA y el desarrollo hasta blastocisto (Seli *et al.*, 2004).

Existen diferentes criterios en los laboratorios para implantar el cultivo a blastocisto, que hacen referencia sobre todo al día en que se toma la decisión (por ejemplo, número de folículos, ovocitos fertilizados, embriones a 8 células en día 3...) (Rodríguez *et al.*, 2013). Si en la cohorte no se dispone de suficientes embriones de buena calidad se procede a hacer la transferencia embrionaria en D+3. Uno de los argumentos en contra del cultivo a blastocisto es la mayor incidencia de cancelación de transferencia debido a un bloqueo en el desarrollo embrionario y un menor número de embriones disponibles para criopreservar, pero se desconoce si este bloqueo en el desarrollo de los embriones de día 3 hasta blastocisto *in vitro*, también sucedería de haber sido transferidos en un estadio más temprano (Racowsky *et al.*, 2000). *In vitro*, el desarrollo embrionario es más lento que *in vivo*, y algunos embriones pueden detener su desarrollo. De hecho, solamente un 41,9 % de los embriones con 7-9 células en día 3 dan buenos blastocistos, siendo este porcentaje del 13,8 % y del 27,5 % cuando los

embriones tienen menos de 7 células o más de 9 respectivamente. A pesar de esto, en pacientes que tienen buen pronóstico, como aquellas menores de 35 años o con un mínimo de 4 embriones de buena calidad disponibles a día 3, se han encontrado tasas de cancelación similares transfiriendo en día 3 y en día 5 (Rodríguez *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

- El estadio de blastocisto es el estadio más recomendado para la transferencia embrionaria.
- Es evidente que el aumento de la tasa de embarazo, la tasa de implantación, la tasa de parto y de recién nacidos vivos es significativamente mayor.
- El embrión escogido para transferir en estadio de blastocisto, viene de una cohorte de embriones de día 3 que ha pasado por un proceso de selección natural hasta día 5, compitiendo contra otros embriones que no han llegado a esta fase, de manera que muestran una mayor capacidad de implantación y menos posibilidad de finalizar en aborto.
- La transferencia en blastocisto permite realizar transferencias de embrión único, disminuyendo los riesgos de las gestaciones múltiples.
- La transferencia embrionaria en D+4 podría ser una variante a investigar en profundidad, aunque por el momento la transferencia en D+5 está más estandarizada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alikhani M, Calderón G, Tomkin G. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in vitro*. *Hum Reprod*; (2000) 15:2634-43.

Arteaga M, García MI. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. Editorial Panamericana. (2014) pp 123-127.

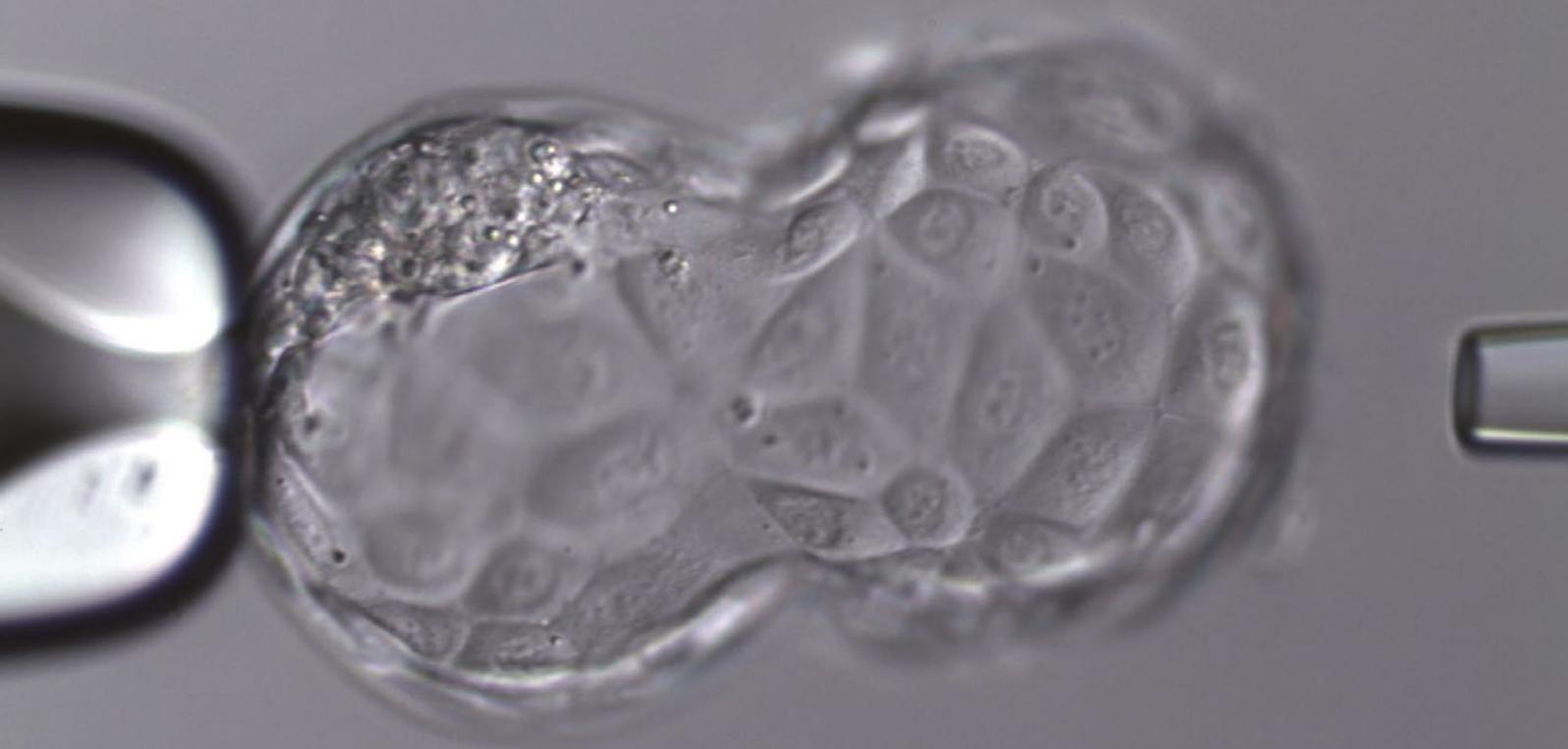
Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev*; (2005) CD002118.

Elgindy EA, Abou-Setta AM, Mostafa MI. Blastocyst-stage versus cleavage-stage embryo transfer in women with high estradiol

- concentrations: randomized controlled trial. *RBM Online*; (2011) 23:789-98.
- Feil D, Henshaw RC, Lane M. Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. Department of Obstetrics and Gynecology. Research Centre for Reproductive Health, the University of Adelaide, Adelaide, Australia. *Hum Reprod*; (2008) Vol 23, pp.1505-1510.
- Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Sauzereau MH, Cadoret V, Jamet C, Royere D. Single Day 2 versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod*; (2009) Vol 24, pp. 1051-1058.
- Kissin DM, Schieve LA, Reynolds MA. Multiple-birth risk associated with IVF and extended embryo culture: USA 2001. *Hum Reprod*; (2005) 20:2215-23.
- Nyboe-Andersen A, Goossens V, Ferraretti AP. The European IVF-Monitoring (EIM) Consortium for the European Society of Human Reproduction Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*; (2008) 23:756-71.
- Pandian Z, Templeton A, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. *Hum Reprod*; (2005) 20:2681-87.
- Papanikolaou G, Kolibianakis M, Tournaye H, Venetis A, Fatemi H, Tarlatzis B, Devroey P. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. Centre for Reproductive Medicine, University Hospital, Vrije Univesiteit Brussel (Free University of Brussels), Laarbeeklaan 101, B-1090 Brussels, Belgium. *Hum Reprod*; (2008) Vol 23, pp. 91-99.
- Practice Committee of the SART, Practice Committee of the ASRM. Elective single-embryo transfer. *Fertil Steril*; (2012) 97:835-42.
- Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril*; (2000) 73:558-64.
- Rodríguez M, Prats L, Cairó O, Del Río F, Brassesco A, Brassesco M. Ventajas e inconvenientes de la transferencia embrionaria en D+3 y en blastocisto. *Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH, Clínica Corachan)*. Barcelona. *Ibe Fertil*; (2013) Vol 30 n° 3.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculate spermatozoa impacts on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*; (2004) 82:378-83.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod*; (2004) 19:2849-58.
- Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertil Steril*; (2010) 94:543-48.
- Wang YA, Kovacs G, Sullivan EA. Transfer of a selected single blastocyst optimizes the chance of a healthy term baby: a retrospective population based study in Australia 2004-2007. *Hum Reprod*; (2010) 25:1996-2005.

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

ENFERMEDADES MITOCONDRIALES. FECUNDACIÓN IN VITRO TRIPARENTAL

MITOCHONDRIAL DISEASES. TRI-PARENTHOOD FERTILISATION

Elisa Álvarez Socías^{ab}

^aEstudiante de Postgrado Oficial en Instituto Valenciano de Infertilidad (Plaza de la Policía Local, 3, 46015, Valencia) y ^b Embrióloga en Create Fertility (3-5 Pepys Road, SW20 8NJ, Londres).
elisaalvarez90@gmail.com

Resumen: La disfunción mitocondrial está relacionada con enfermedades, con infertilidad ligada a la edad y con repetidos ciclos fallidos de fecundación in vitro (FIV). Las terapias de replazo mitocondrial en ovocitos o cigotos como son la transferencia pronuclear, la transferencia del huso meiótico materno, o la transferencia del corpúsculo polar podrían prevenir la transmisión de ADN mitocondrial (ADNmt) mutado a la segunda generación a través de la herencia materna, evitando así la transmisión de enfermedades ligadas a estas anomalías. Además, pueden ser de utilidad para la transferencia citoplasmática en pacientes de edad avanzada con repetidos ciclos fallidos al presentar un citoplasma con deficiencias y, que con ésta técnica se podrían beneficiar de una mayor tasa de embarazo después de someterse a un tratamiento de FIV. Aun así, estas técnicas englobadas en lo que se denomina FIV triparental, siguen ocasionando mucha controversia respecto a su eficacia y a sus efectos futuros sobre los recién nacidos y, es por esto que necesitan de una mayor investigación y de un mayor refuerzo por parte de comités éticos que las regulen y las legislen.

Palabras clave: mitocondria, ADN mitocondrial, ADNmt residual, transferencia pronuclear, transferencia del huso meiótico, transferencia del corpúsculo polar, FIV triparental.

Summary: The mitochondrial dysfunction is related with diseases, age related infertility and repetitive failed IVF cycles. The mitochondrial replacement therapies in oocytes or zygotes as the pronuclear transfer, the maternal spindle transfer or the polar body transfer could prevent the transmission of the mutated mitochondrial DNA (mtDNA) to the second generation via maternal heritage, avoiding the transmission of diseases that are link to those abnormalities. Thus, these techniques can be helpful for the cytoplasmic transfer on aged patients with repetitive failed IVF cycles as they show a deficient cytoplasm and, they could take advantage of these techniques to improve their pregnancy rates after undergoing and IVF cycle. However, these techniques included under the name of tri-parenthood fertilisation are still having a great controversy due to their efficiency and their future effects on new-borns. Therefore, they need more research and greater reinforcement by ethical committees that regulate and legislate them.

Keywords: mitochondria, mitochondrial DNA, mtDNA, pronuclear transfer, maternal spindle transfer, polar body transfer, tri-parenthood fertilisation.

INTRODUCCIÓN

Mutaciones en el ADNmt o en genes nucleares que participan en la función mitocondrial son la causa de infertilidad y enfermedades neuromusculares y degenerativas, no sólo en los individuos, sino también en su descendencia (DiMauro and Davidzon, 2005). La prevalencia de padecer una enfermedad mitocondrial sintomática debido a la mutación del ADNmt es de 1:8000 (Scarpulla, 2008). Dado que la detección fiable y predecible de los trastornos mitocondriales en los embriones

y ovocitos es inalcanzable en la actualidad, la sustitución parcial o completa de ADNmt mutado con el ADNmt de donante a través de manipulaciones de embriones ha supuesto un enfoque alternativo para abordar esta problemática. Los métodos que están potencialmente disponibles en la actualidad para lograr este objetivo son los que se engloban bajo el nombre de Fecundación in vitro triparental.

En contraste con el genoma nuclear, donde son habituales las familias de secuencias repetitivas, intrones y

regiones intergénicas, el ADNmt de los mamíferos y otros vertebrados exhibe una sorprendente economía en la organización de su secuencia génica. El genoma mitocondrial de vertebrados se halla en forma de molécula circular cerrada de ~16.5 kb cuya capacidad de codificación de proteínas es exclusivamente destinada a la síntesis de 13 proteínas que funcionan como subunidades esenciales para los complejos respiratorios I, III, IV, V (Clayton, 2003).

El hecho de que el ADNmt sea un elemento extra cromosómico

compartimentado contribuye a un tipo de herencia que difiere de la de los genes nucleares. Las células somáticas de mamíferos tienen generalmente 103-104 copias de ADNmt con ~2-10 genomas por orgánulo. Estos genomas se replican de manera independiente del ciclo celular que se rige por la replicación del ADN nuclear (Wilson et al., 2016). En mamíferos, el ADNmt se hereda por vía materna y no sigue un patrón de herencia mendeliana. En humanos, el ADNmt paterno se pierde durante la fecundación por un mecanismo dependiente de ubiquitina mediado por endonucleasas (Fernández-Silva et al., 2003). Los beneficios de una herencia mitocondrial uniparental es evitar el paso de mutaciones deletéreas por el gameto no sometido a control (las mitocondrias espermáticas llegan a los ovocitos con daños en su ADN y sin haber experimentado ningún control). Debido a este tipo de herencia se reducen al mínimo las copias del genoma mitocondrial en un ovocito produciendo un cuello de botella que eliminaría las copias defectuosas. El

hecho de que el ADNmt sea un genoma de múltiples copias hace que un individuo pueda albergar más de una sola secuencia, una condición conocida como heteroplasmia. Una variante de la secuencia que contenga una mutación, y sea por tanto perjudicial, puede ser tolerada en bajo número de copias, porque el producto del gen defectuoso que codifica no alcanza el umbral para alterar la función celular. Sin embargo, se conocen variantes de la secuencia que segregan rápidamente desde heteroplasmia a homoplasmia al pasar de una generación a la siguiente (Wilson et al., 2016). Esto puede resultar en que la variante perjudicial predomina en la descendencia, lo que conduce a un fenotipo mitocondrial defectuoso (Wilson et al., 2016; Shoubridge, 2000).

Cabe destacar que el genoma mitocondrial no está protegido por histonas por lo que su tasa de mutación es más elevada que la del ADN nuclear. El estrés oxidativo en el ADNmt, junto con un desequilibrio en la cadena respiratoria mitocondrial y en la homeostasis del

Ca²⁺, la excitotoxicidad, la apoptosis, los cambios en la permeabilidad de membrana, y los sistemas de defensa mitocondriales son las causas notables del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Castro et al., 2012).

Alternativas a la terapia génica de la línea germinal, como son el diagnóstico prenatal y el diagnóstico preimplantacional (DGP), se han descrito para las parejas en riesgo de transmitir los trastornos derivados de mutaciones en el ADNmt. Aunque estas técnicas son potencialmente útiles para las condiciones de baja heteroplasmia, son ineficaces para las condiciones de homoplasmia donde la carga mutante de ADNmt del paciente puede llegar a ser del 100% y, además, la variación entre blastómeros de un mismo embrión limita la efectividad de este tipo de test. Las técnicas de transferencia de genoma nuclear (la transferencia pronuclear, la transferencia del huso meiótico y la transferencia del corpúsculo polar) en un ovocito

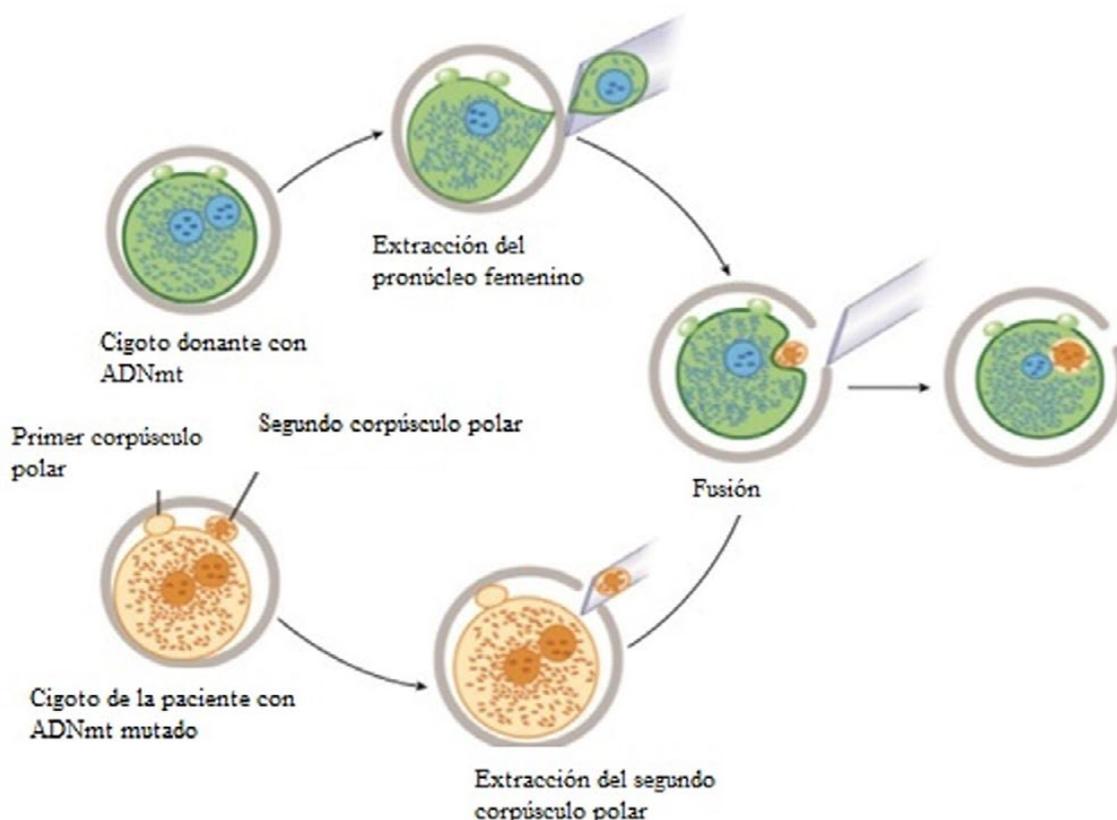


Figura 1. Representación esquemática de la transferencia pronuclear en embriones en estadio de cigotos (Wolf, 2015)

enucleado que contenga mitocondrias sin mutaciones probablemente sería una buena elección para prevenir de manera efectiva la transmisión de enfermedades mitocondriales (Mitalipov et al., 2014).

MATERIAL Y MÉTODOS

La búsqueda de esta revisión bibliográfica se ha realizado mediante las bases de datos PubMed (NCBI), Google Académico (Google), las revistas *Fertility & Sterility* y *Human Reproduction* y la página web de la Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) con artículos comprendidos entre 1983 a 2016. Las palabras clave usadas en la búsqueda bibliográfica fueron las siguientes: 'mitochondria', 'mitochondrial DNA', 'mitochondrial disease', 'pronuclear transfer', 'maternal spindle transfer', 'polar body transfer', 'tri-parenthood fertilisation', 'oocyte', 'gamete' y 'embryo'. La finalidad de esta revisión fue conocer las bases teóricas que sustentan las técnicas englobadas bajo el nombre de fecundación in vitro triparental y la metodología usada (desde sus inicios hasta la actualidad), así como reunir y analizar las evidencias a favor y en contra de la técnica, tanto a nivel de metodología como a nivel de normativa y conflictos éticos asociados.

RESULTADOS

TRANSFERENCIA PRONUCLEAR

El estadio de cigoto en mamíferos se caracteriza por la presencia de dos pronúcleos (PN) claramente visibles y que contienen ADN nuclear haploide proveniente o bien del espermatozoide o bien del ovocito. La transferencia pronuclear (PNT) de cigoto a cigoto fue llevada a cabo por primera vez durante la década de los 80, cuando se demostró que los ratones manipulados por esta técnica daban lugar a descendencia. Ha sido más recientemente utilizada para la terapia de reemplazo mitocondrial, pero la técnica utilizada en ratones se ha visto negativamente afectada por los altos niveles de ADNmt residual en las crías (Sato et al., 2005).

El pronúcleo masculino y el pronúcleo femenino ambos altamente visibles y de apariencia similar, son extraídos (enucleación) después de un tratamiento mediante inhibidores del citoesqueleto (*nocodazole* y *cytochalasin B*), tanto del ovocito de la paciente como del ovocito de la donante mediante la aspiración de carioplastos usando técnicas de micromanipulación (ver Figura 1). Hay que tener en cuenta que el carioplasto proveniente del ovocito de la paciente contiene tanto mitocondrias como ADNmt, conocido como *carryover* o residual. Los carioplastos que contienen los PN de la paciente se ponen en contacto con el citoplasma de los ovocitos de la donante. Las dos entidades se fusionan produciendo un embrión reconstruido que estaría listo para el cultivo o la transferencia embrionaria a la paciente. Debido a que con la inyección de los PN de la paciente se ha arrastrado también parte de sus mitocondrias, el cigoto reconstruido aún puede contener cantidades inaceptables de ADNmt mutado (McGrath and Solter, 1983).

Los resultados en ratones no fueron buen presagio para las técnicas de reemplazo mitocondrial (MRT) en los seres humanos. Sin embargo, en 2010 se informó de la viabilidad de la PNT en humanos usando cigotos anormales, ya fuera con uno o más de dos PN, que normalmente se desechaban durante la rutina de la fecundación in vitro. El 8% de los embriones creados por transferencia nuclear se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto con niveles bajos de ADNmt residual (<2%). A pesar del bajo rendimiento de embriones que llegaban al estadio de blastocisto, los autores concluyeron que este enfoque arrojaba potencial a la técnica del reemplazo mitocondrial. Sin embargo, es imposible en la actualidad evaluar la seguridad y la eficacia de PNT en cigotos humanos normales sobre la base de este informe preliminar, ya que se tiene que seguir la investigación en primates no humanos antes de llegar a una conclusión definitiva en la viabilidad PNT como una técnica de MRT en humanos (Craven et al., 2010; Tachibana et al., 2009).

TRANSFERENCIA DEL HUSO MEIÓTICO

La transferencia del huso meiótico (ST) aplicada en ovocitos de macaco (*Macaca mulatta*) demostró en 2009 que la transferencia por reemplazo mitocondrial podía ser usada en estadio de ovocito no fecundado. Se demostró la eficacia y la seguridad de la técnica al obtener nacidos vivos los cuales tenían curvas normales de crecimiento y bajos niveles de ADNmt residual (Tachibana et al., 2012).

A diferencia de los cigotos, la distribución de las mitocondrias en los ovocitos es uniforme, lo que permite llevar a cabo la técnica de transferencia del huso meiótico sin un significativo arrastre del ADNmt del ovocito que dona el núcleo (Tachibana et al., 2012).

El huso meiótico rodeado por un pequeño volumen de citoplasma y de membrana es extraído del ovocito de la paciente y del ovocito de la donante. Estos carioplastos contienen sólo el 1.5% del volumen del citoplasma. Los carioplastos de los ovocitos de pacientes son fusionados en el citoplasma de los ovocitos donantes (previamente enucleados) y fecundados por el espermatozoide de la pareja (ver Figura 2) creando un embrión libre de mutaciones en el ADNmt (Tachibana et al., 2013).

Se llevó a cabo un estudio en hembras de macacos de origen indio y macacos de origen chino portadoras de diferentes haplotipos de ADNmt *wildtype* que fueron identificadas basándose en secuencias de polimorfismos. Los carioplastos de los macacos de origen chino se fusionaron con ovocitos donantes de macacos de origen indio y viceversa para crear ovocitos reconstruidos con donantes de ADNmt. Se fecundaron mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y los embriones resultantes se cultivaron hasta blastocisto. El desarrollo y la calidad de los embriones fue comparable a la de los controles, y se establecieron dos líneas de células madre embrionarias (ESCs) a partir de 8 embriones a los que se

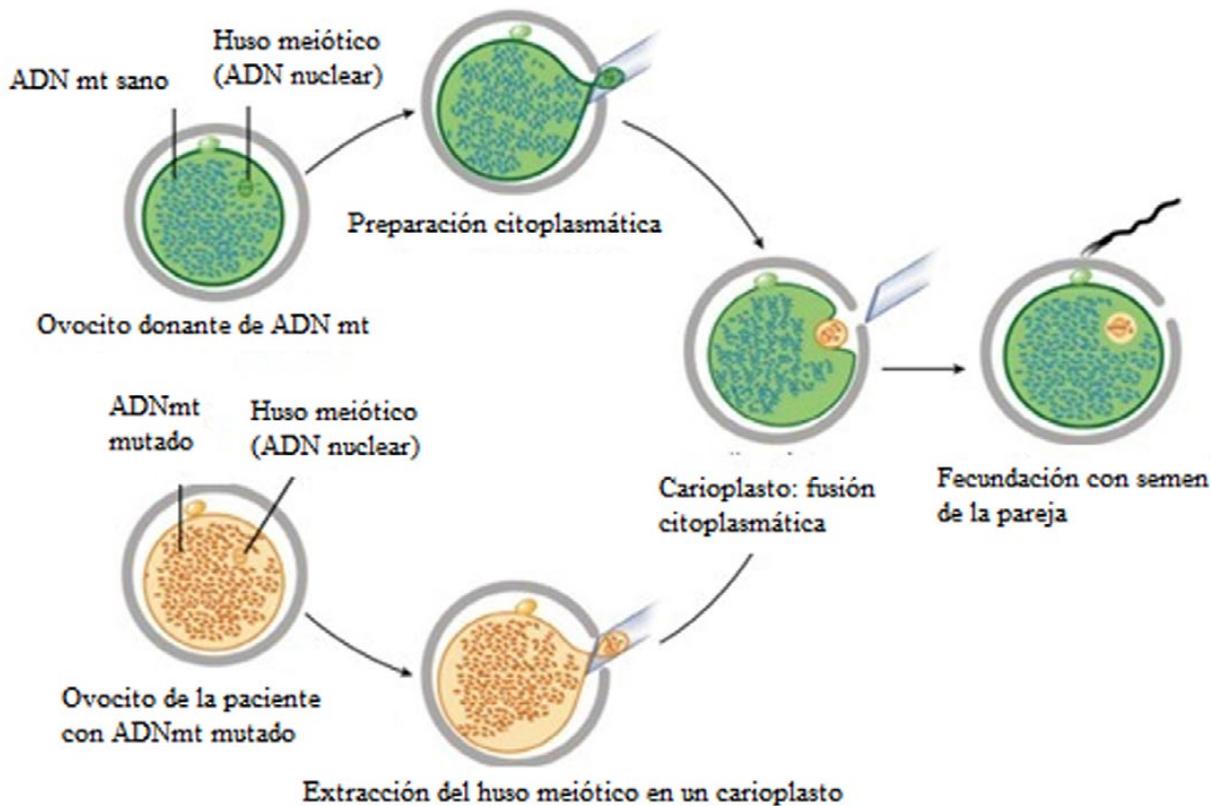


Figura 2. Representación esquemática de la transferencia del huso meiótico (Wolf, 2015).

les había realizado transferencia del huso meiótico siendo la eficiencia en la derivación comparable a la de los controles. Quince blastocistos se transfirieron a nueve hembras, dando lugar a tres embarazos y a cuatro nacidos vivos. La eficiencia fue similar a los resultados con embriones no manipulados (embriones control). Como se puede observar en la Figura 3, las crías de los macacos provenientes de la transferencia de huso meiótico tenían curvas de crecimiento normales, cantidades residual de ADNmt por debajo o igual al 2% y niveles normales de ATP (Paull et al., 2013).

Estos resultados en macaco alentaron los estudios en humanos donde donantes de ovocitos con diferentes haplotipos de ADNmt fueron reclutados con fines de investigación. De 106 ovocitos donados a investigación, 65 fueron sujetos a transferencia recíproca del huso meiótico y 33 fueron

usados como controles. Las tasas de fecundación en ovocitos a los que se les había practicado la transferencia del huso fueron del 73%, muy similar a la de los controles (75%). Sin embargo, una porción significativa de los cigotos presentaba fecundación anormal (la mayoría de ellos con la presencia de tres pronúcleos). Este resultado reflejaba la activación prematura del ovocito a causa de condiciones de cultivo subóptimas. De los cigotos que presentaban una fecundación normal, sus tasas de desarrollo a blastocisto (62%) y de aislamiento de las células madre embrionarias (38%) fueron comparables con los controles, a la vez que se estimaron que los niveles de ADNmt residual eran indetectables (Tachibana et al., 2013; Paull et al., 2013).

La viabilidad de los ovocitos humanos con el huso meiótico transferido fue examinada mediante la activación artificial para mimetizar la

fecundación y su posterior desarrollo. Algunos embriones partenogénicos progresaron a blastocisto dando lugar a la derivación de ESCs. Los niveles de ADNmt heteroplasmático en las líneas de ESCs fueron menores al 1%. Aunque este estudio fue llevado a cabo con embriones partenogénicos, los resultados eran consistentes con la conclusión de que la técnica de transferencia del huso meiótico podía ser consumada en humanos con el mínimo nivel de ADNmt residual (Paull et al., 2013).

TRANSFERENCIA DEL CORPÚSCULO POLAR

Los ovocitos humanos durante la meiosis sufren dos divisiones con reducción de la carga cromosómica con la segregación desigual del citoplasma y la extrusión de dos corpúsculos polares. El primer corpúsculo polar contiene un set diploide de cromosomas, y el segundo

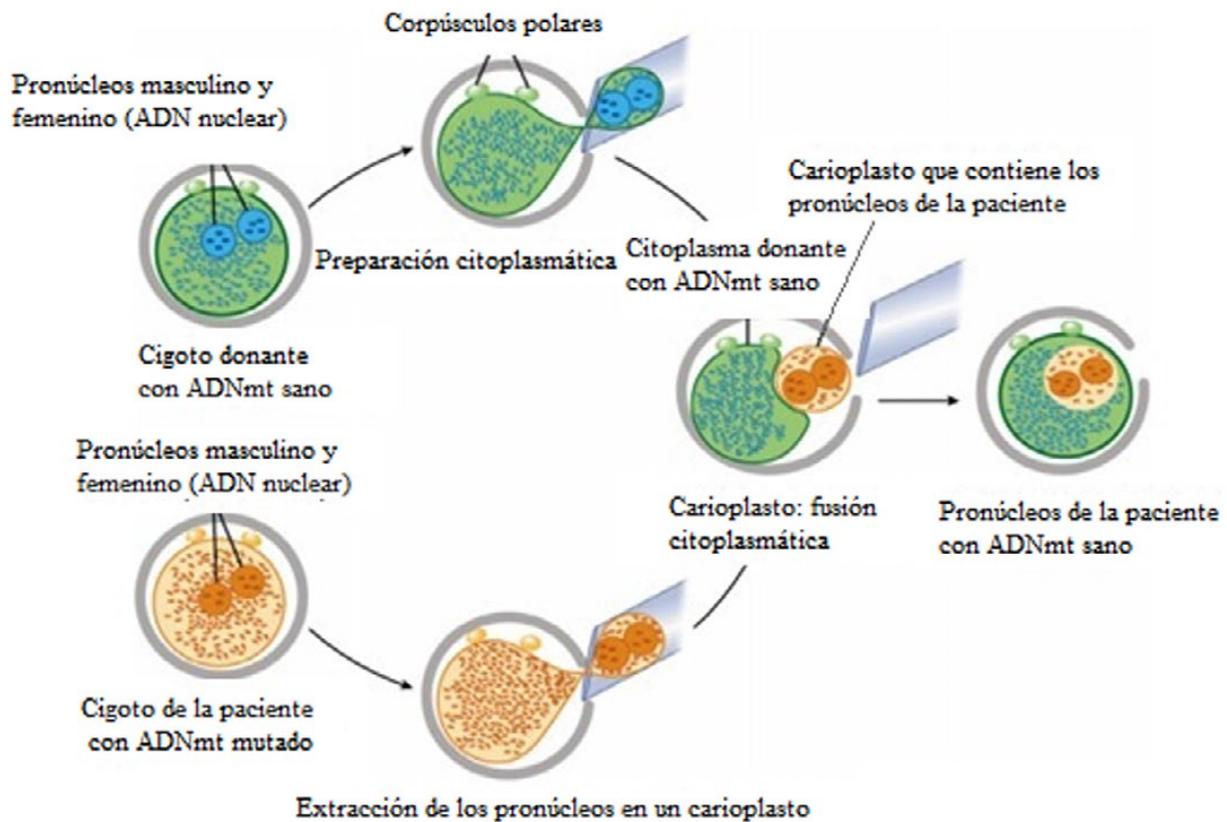


Figura 3. (A) Curvas de crecimiento basadas en las medidas del peso (kg) mostrando que la descendencia derivada de la transferencia del huso meiótico estaba en el rango normal para los 30 primeros meses de vida. (B) Niveles de ADNmt residual (% de heteroplasmia) en cuatro macacos (Mito, Tracker, Spindler y Spindy), medido en sangre del cordón umbilical en el nacimiento y en piel a los 19 meses. Los niveles se encontraban en los límites de detección y no cambiaron significativamente durante el tiempo (Wolf, 2015).

corpúsculo está dotado de un set haploide de cromosomas y se extrae después de que el espermatozoide haya fecundado el óvulo (Wakayama and Yanagimachi, 1998).

En la técnica de la transferencia del corpúsculo polar se usa un cigoto donante con ADNmt sano al cual se le extrae el pronúcleo femenino. Al cigoto donante se le fusiona el segundo corpúsculo polar proveniente del cigoto de la paciente que contiene ADNmt mutado tal y como se muestra en la Figura 4 (Wakayama and Yanagimachi, 1998).

En ratones, a los que se les llevó a cabo la transferencia del segundo corpúsculo polar se observó el desarrollo a término de la descendencia (Wakayama and Yanagimachi, 1998; Wakayama T. et al., 1997). La transferencia del corpúsculo polar ha sido descrita recientemente en el contexto de la terapia por reemplazo mitocondrial.

Su justificación es que los corpúsculos polares que contienen pocas mitocondrias podrían ser fácilmente visualizados y manipulados, mientras su eficiente utilización podría doblar el rendimiento de los ovocitos y cigotos reconstruidos mediante ST y PNT. Usando un enfoque basado en transferencias simultáneas del primer corpúsculo polar y del huso meiótico de 27 ovocitos donantes, se produjeron 43 ovocitos reconstruidos. También se llevaron a cabo transferencias simultáneas del segundo corpúsculo polar y de pronúcleos para incrementar el rendimiento de los cigotos donantes. El número de recién nacidos vivos derivados de la reconstrucción de ovocitos o de embriones fue muy similar al de los controles, y el ADNmt residual, en crías derivadas de la transferencia del primer corpúsculo polar, de la transferencia del segundo corpúsculo polar, de la transferencia del huso meiótico, pero no de la transferencia de pronúcleos, fue muy

bajo o indetectable. Las tasas de nacimiento fueron comparables con los controles, y todas las crías vivas derivadas de ovocitos reconstruidos respiraban normalmente y tenían un rango de peso comparable a la de los controles que no habían sido manipuladas. La transferencia del corpúsculo polar no ha sido replicada con éxito en otros mamíferos (incluidos primates) a pesar de los considerables esfuerzos. En muchas especies, los corpúsculos experimentan unas altas tasas de degeneración debido a las presiones apoptóticas que causan fragmentación del ADN y su degradación (Wakayama T. et al., 1997; Daughtry and Mitalipov, 2014).

En humanos, los esfuerzos se han centrado en el análisis genético del corpúsculo polar para la evaluación de enfermedades; sin embargo, su capacidad funcional para la transferencia del corpúsculo polar permanece sin determinar. Los

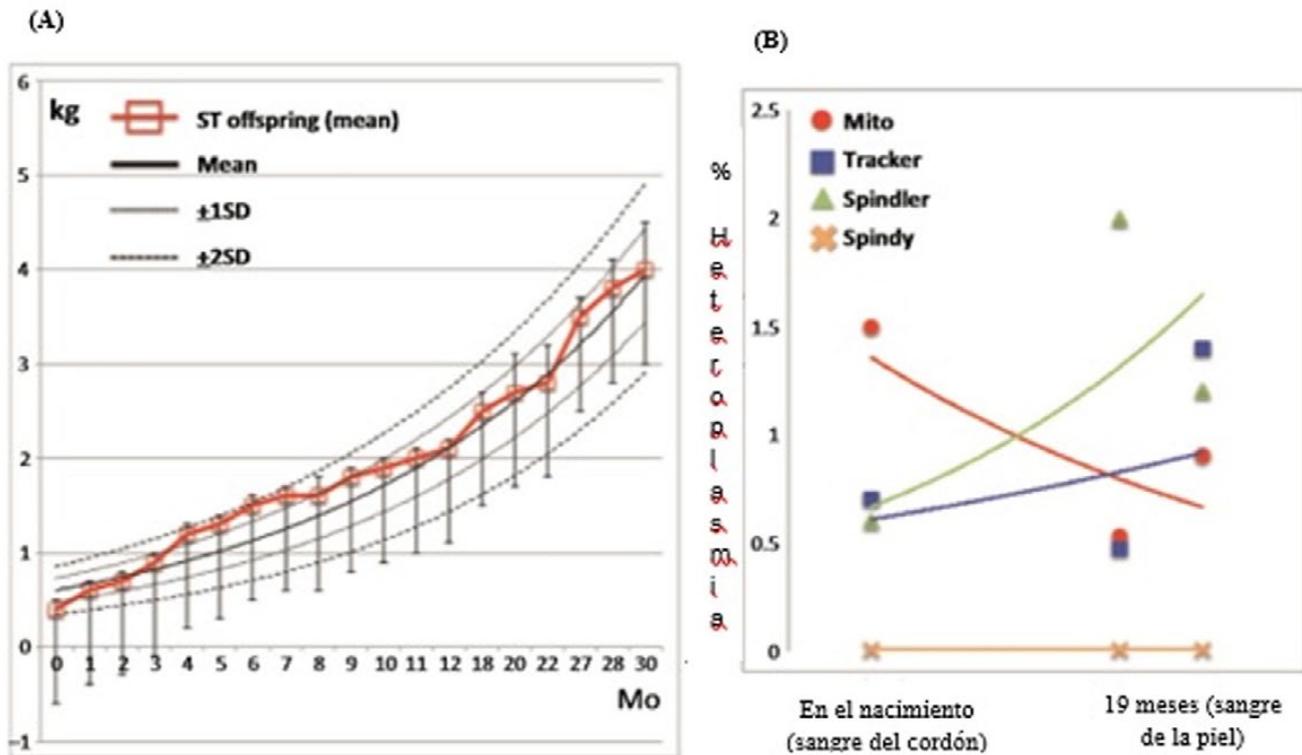


Figura 4. Representación esquemática de la transferencia del segundo corpúsculo polar (Wolf, 2015).

esfuerzos por aislar corpúsculos polares viables después de una estimulación ovárica en pacientes podrían ser contraproducentes si hubiera alteraciones sustanciales en los tiempos del cultivo de los ovocitos y por consiguiente, de sus corpúsculos polares (Daughtry and Mitalipov, 2014).

TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL PARA PACIENTES INFÉRTILES

La edad avanzada de la mujer (mayor de 35 años) es uno de los factores determinantes cuando se habla de infertilidad, abortos o defectos en el nacimiento como puede ser el Síndrome de Down. Diversos estudios apuntan que a medida que aumenta la edad de la paciente, su calidad ovocitaria disminuye siendo ésta la principal causa de su infertilidad. En pacientes con edad avanzada se observa una maduración citoplasmática despereja que podría explicar el aumento en anomalías y aneuploidías causadas por fallos tanto en el proceso de meiosis como

en el de mitosis. Las deficiencias citoplasmáticas de estos ovocitos se observan en una deficiencia en sus transcritos y proteínas que podrían causar un impacto en el desarrollo del embrión preimplantatorio (Minami et al., 2007; Tanget al., 2007). Se han observado asociaciones entre el aumento de la edad de la paciente y el aumento de la tasa de mutación en el ADNmt de los ovocitos, la disminución de la actividad metabólica embrionaria, la disminución en la producción de ATP, y la alteración de la homeostasis del calcio mitocondrial. Además, se observa un aumento de deleciones en el ADNmt descritas en las células del cúmulo que son las que rodean al ovocito dándole a su vez un aporte metabólico. Las deficiencias citoplasmáticas en general y la disfunción mitocondrial en particular pueden contribuir a la inestabilidad del genoma nuclear en ovocitos provenientes de mujeres en edad avanzada, resultando en un embrión aneuploide. Pacientes de edad avanzada que no poseen ovocitos propios criopreservados durante una

edad temprana reproductiva, ven como sus tratamientos de FIV se ven limitados a la utilización de ovocitos y embriones de donante. Con el uso de la técnica del remplazo mitocondrial este tipo de pacientes se podría beneficiar del remplazo completo del componente citoplasmático a la vez que se mantendría el ADN nuclear de la mujer de la pareja para intentar mejorar la calidad embrionaria (Eichenlaub-Ritter et al., 2001).

En 1998-1999, la primera transferencia citoplasmática realizada por Cohen et al. fue usada para transferir un pequeño volumen de citoplasma (1-5%) del ovocito donante en ovocitos de pacientes que habían sufridos fallos repetidos en ciclos de FIV. Han nacido ya más de 40 niños y la técnica se aplicó a una velocidad sorprendente en los seres humanos, en ausencia de una amplia investigación para evaluar la eficacia y los posibles riesgos del método, por lo que se puso en duda la técnica en distintas publicaciones (Eichenlaub-Ritter et al., 2001; Cohen et al., 1998).

DILEMAS ÉTICOS Y LEGISLACIÓN

La terapia génica en células somáticas no ha causado grandes controversias por lo referente a su aceptación ética principalmente porque los cambios genéticos no se transmiten a la descendencia. Por lo contrario, la terapia génica en la línea germinal lleva implícita la corrección permanente de genes mutados en las células germinales, resultando en la transferencia de esas alteraciones a las subsecuentes generaciones. Si tomamos como significado de modificación la introducción de nuevo material genético en los gametos (o embrión temprano), en el caso de la técnica de remplazo mitocondrial se introduce ADNmt de la donante no sólo a la descendencia, sino también a la siguiente generación (esta vez se restringe al linaje femenino). Si, por el contrario, consideramos modificación de la línea germinal únicamente la realización de cambios en el ADN nuclear, las técnicas de remplazo mitocondrial no supondrían una modificación de la línea germinal. Cabe destacar que es bien sabido que el ADNmt no codifica para componentes determinantes en la identidad genética o de parentesco (Robertson, 1999).

En cuanto a la aplicación de las técnicas de transferencia citoplasmática o de las técnicas de remplazo mitocondrial, se criticó sobre todo su introducción prematura, señalándose la ausencia de investigación básica y preclínica, así como de adecuados controles experimentales y falta de discusión pública ética y crítica. En las primeras aplicaciones de la transferencia citoplasmática, se informaron un número relativamente alto de anomalías cromosómicas y defectos en el recién nacido, por ello, a pesar de no estar claro si estaba relacionado con la técnica per se, ante la preocupación de los organismos reguladores, la Food and Drug Administration (FDA) declaró en 2001 que la transferencia citoplasmática y los protocolos relacionados estaban sujetos a revisión y aprobación formales. Así, se prohibieron de forma prematura los ensayos clínicos necesarios para abordar estas cuestiones debido al

carácter controvertido que suscitaba la manipulación de gametos (Hawes et al., 2002).

El problema conceptual entre el remplazo mitocondrial y la transferencia citoplasmática se basa en el hecho de si se entienden o no como modificación de la línea germinal, lo que llevará a un diferente análisis normativo de la misma, ya que la modificación de la línea germinal humana es éticamente mucho más controvertida que la modificación genética de la línea somática. La modificación de la línea germinal humana está prohibida por órganos internacionales, como el Consejo de Europa. Sin embargo, algunos países hacen una distinción legal entre ambas. La Ley holandesa de Embriones (2002), por ejemplo, deja espacio para la modificación del ADNmt pero prohíbe la del ADN nuclear. La evaluación ética de la modificación de la línea germinal (en el contexto de los trastornos de ADNmt) difiere de si se trata de la transferencia del ST o del PNT. Ambas implican la donación de ADNmt, pero la última implica la creación y destrucción de un embrión durante el proceso de la técnica, lo que puede chocar con ciertas ideologías religiosas (Bredenoord et al., 2008).

En el Reino Unido, en febrero del 2015 se aprobó la ley que permite el uso de la transferencia del huso meiótico materno y la transferencia pronuclear para evitar enfermedades mitocondriales severas. En la página web de la Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA) se aclara que antes de que una clínica pueda poner en práctica estas técnicas, deberá seguir un proceso de licencia que consta de dos pasos: necesitarán aplicar para una licencia que les permita realizar la transferencia del huso meiótico y/o la transferencia pronuclear y luego pedir autorización para llevar a cabo el tratamiento de una paciente en concreto. Además, se requerirá que las clínicas presenten información sobre las donantes de mitocondrias, los pacientes que van a ser tratados y el proveedor de esperma, y del tratamiento al que se someten (HFEA website).

Por otra parte, se deben examinar las cuestiones éticas con respecto a si los niños resultantes de estas técnicas pueden ser correctamente considerados como si tuvieran dos o tres padres (la técnica se conoce comúnmente como FIV triparental). Tras la transferencia citoplasmática o las técnicas de remplazo mitocondrial el embrión hereda la gran mayoría de su ADN de la madre y el padre intencional, más un porcentaje de ADNmt de la donante de ovocitos. Para poner esto en perspectiva: la donante podría contribuir en un 0.1% de su ADN, mientras que los padres intencionales contribuyen al restante 99.90% de su ADN. Estrictamente hablando, tendría tres padres. Algunos sostienen que esta división de la maternidad genética debe ser considerada como el principal problema ético en el debate sobre la técnica. Las consecuencias psicológicas, jurídicas y sociales de tener tres padres genéticos son en gran parte desconocidas. Por otra parte, es discutible si la donante de ovocitos, que contribuye con su ADNmt, debe ser considerada como un 'padre genético'. La variación de secuencias entre diferentes haplotipos mitocondriales en la población humana es pequeña, ya que se trata de unas pocas sustituciones de amino ácidos. Esto tendría fácil solución, ya que es posible reducir las diferencias en ADNmt usando donantes de mitocondrias con el mismo haplotipo (Mitalipov and Wolf, 2014).

Los datos disponibles son insuficientes y no apoyan una decisión prudente acerca de la aplicación de la transferencia citoplasmática y de las técnicas de remplazo mitocondrial. Las razones por las cuales estas técnicas conduzcan a un anormal desarrollo del embrión transferido están lejos de aclararse. Por lo tanto, es necesaria una exhaustiva labor científica y de investigación antes de introducir esta técnica definitivamente en la práctica clínica.

CONCLUSIÓN

La necesidad de la implementación de técnicas de remplazo mitocondrial y de transferencia citoplasmática parece

evidente para familias portadoras de enfermedades debido a mutaciones en el ADNmt y para aquellas pacientes de edad avanzada (sin ovocitos criopreservados en su edad fértil) o con numerosos ciclos fallidos de FIV. Si la necesidad existe, y la ratio riesgo/beneficio es favorable, entonces nos formulamos la pregunta de cómo podríamos avanzar hacia la implementación de éstas técnicas. Se trata de técnicas cuya eficiencia debería ser mejorada por lo que sería necesario generar resultados confirmatorios adicionales. Aún dicho esto, la HFEA ha presentado una revisión bibliográfica sobre los resultados publicados sobre el ST y el PNT que muestran que ambas técnicas son potencialmente útiles para un grupo específico y definido de pacientes cuya descendencia tendría una enfermedad severa o letal producida por mutaciones en su ADNmt, y los cuales no tienen otra opción para engendrar su propia descendencia. El comité concluyó que las evidencias que se tienen actualmente no sugieren que las técnicas sean 'inseguras'. Sin embargo, las primeras aplicaciones clínicas deberían ser llevadas a cabo en clínicas especializadas en enfermedades mitocondriales que impliquen ensayos clínicos. Se debería ofrecer una amplia información y apoyo a las familias inscritas en dichos ensayos y su participación debería estar comprometida a su consentimiento para el seguimiento de los hijos nacidos por estas técnicas.

Mirando mucho más lejos en el futuro, últimamente están emergiendo las tecnologías de edición del genoma y se erigen como las técnicas que permitirían la corrección dirigida de genes mutados en células humanas. Estas correcciones implican la modificación precisa de las secuencias de genes añadiendo, eliminando o corrigiendo *locis* genómicos específicos. Esos avances probablemente permitirán la corrección selectiva de defectos genéticos nucleares o mitocondriales en gametos humanos o embriones preimplantatorios, impidiendo así en última instancia el paso de la mayoría

de las condiciones genéticas anómalas y evitando el uso de ADNmt de donante eliminando así la participación del tercer 'progenitor' genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fernández-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, 2003, 88(1):41-56.

DiMauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Am J Med Genet*, 2005, 37: 222-232.

Scarpulla RC. Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiol Rev*, 2008, 88: 611-638.

Clayton DA. Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life*, 2003, 55: 213-217.

Wilson IJ, Carling PJ, Alston CL *et al.* Mitochondrial DNA sequence characteristics modulate the size of the genetic bottleneck. *Hum Mol Genet*, 2016, 1; 25(5):1031-41.

Bredenoord AL, Pennings G, de Wert G. Ooplasmic and nuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disorders: conceptual and normative issues. *Human Reprod*, 2008, 14:669-78.

Castro MR, Suarez E, Kraiselburd E, *et al.* Aging increases mitochondrial DNA damage and oxidative stress in liver of rhesus monkeys. *Exp Gerontol*, 2012, 47:29-37.

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

Craven L. *et al.* Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2010, 465:82-85.

Daughtry B. and Mitalipov S. Concise review: parthenote stem cells for regenerative medicine: genetic, epigenetic, and developmental features. *Stem Cells Transl. Med.*, 2014, 3:290-298.

Eichenlaub-Ritter U. *et al.* Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation

in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 5, 2001, 783-796.

Hawes SM, Sapienza C, Latham KE. Ooplasmic donation in humans: the potential for epigenetic modifications. *Hum Reprod*, 2002, 17:850-2.

HFEA website: <http://www.hfea.gov.uk/9933.html>.

McGrath J. and Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220:1300-1302.

Minami N. *et al.* Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J. Reprodu. Dev*, 2007, 53:707-715.

Mitalipov S, Wolf P. Clinical and ethical implications of mitochondrial gene transfer. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(1):5-7.

Mitalipov S. *et al.* Limitations of preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA diseases. *Cell Rep*, 2014, 7:935-937.

Paull D. *et al.* Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature*, 2013, 493:632-637.

Robertson J.A. Reconstituting eggs: the ethics of cytoplasm donation. *Fertil. Steril*, 1999, 71:219-221.

Shoubridge EA. Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum Reprod*, 2000, 15: 229-234.

Tachibana M. *et al.* Chromosome transfer in mature oocytes. *Fertil. Steril*, 2012, 97:e16.

Tachibana M. *et al.* Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 461:367-372.

Tachibana M. *et al.* Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 2013, 493:627-631.

Tang F. *et al.* Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev.*, 2007, 21:644-648.

Wakayama T. and Yanagimachi R. The first polar body can be used for production of normal offspring in mice. *Biol. Reprod*, 1998, 59:100-104.

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, 110:263-266.

Wolf D, Mitalipov N, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapy in reproductive medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 2015; 21(2):68-76.

TIME - LAPSE



La solución más fiable para mejorar el cultivo y la evaluación embrionaria mejorando las tasas de éxito en FIV.

OCTAX NAVILASE



Para un perfecto control de la biopsia embrionaria con una mayor facilidad y eficacia.

Un nuevo láser con tecnología específica para PGS y DGP.

LOG & GUARD



La monitorización continua de los parámetros críticos de control de calidad en su laboratorio de FIV, protege los embriones y optimiza el tiempo del personal.

FERTIPROOF



Asegurar la identificación del paciente y el manejo de la muestra desde la punción folicular hasta la crio-preservación. Con total trazabilidad.

RAPIDVIT & RAPIDWARM OMNI



Sistema de Vitrificación rápido, fácil y con excelentes resultados en todos los estadios celulares.

AGUJAS ASPIRACIÓN FOLICULAR VITROLIFE



Diseñadas para la recuperación ovocitaria. Optimizando el tiempo, el control en la aspiración y mejorando el confort de la paciente.

VITROLIFE LABWARE



Para mejorar las condiciones de cultivo de los embriones.

MICROPIPETAS VITROLIFE



Micropipetas de alta precisión. Toda gama de tipos y angulaciones.

CONTROL DE CALIDAD EN UN LABORATORIO DE FIV

Beatriz Amorocho Llanos

IVI MURCIA.

Beatriz.Amorocho@ivi.es

¿QUÉ HAY DETRÁS DE GAMETOS Y EMBRIONES EN UN LABORATORIO DE FIV?

En un laboratorio de FIV, no solo hay que tener en cuenta la rama de la embriología clínica propiamente dicha, sino que se debe de implementar un sistema de gestión de calidad siguiendo las normativas legales para garantizar la calidad del servicio que se les ofrece a los pacientes.

Para que un laboratorio de fecundación in vitro tenga buenos resultados en tasas de gestación, implantación y recién nacido vivo en casa, se deben de llevar a cabo ciertos requisitos los cuales se engloban en un programa de control de calidad.

Se entiende por control de calidad como el seguimiento, supervisión y evaluación que asegure que cada trabajador y cada unidad de trabajo alcance aquellos estándares que consecuentemente brinden servicios de buena calidad. Actualmente existen muchas posibilidades para que los resultados reproductivos en FIV aumenten debido a la introducción y mejora de un programa de control de calidad en los laboratorios de Fecundación in vitro (FIV); Para ello, se requiere una Organización general, Recursos Humanos y Recursos físicos. (Castilla et al., 2006)

1. ORGANIZACIÓN GENERAL

Para la organización de un laboratorio de reproducción asistida, se necesitan tres estructuras básicas:

- Sistemas de gestión de calidad.
- Ética e investigación
- Seguridad y Riesgos laborales

Sistemas de gestión de calidad

Para que un centro de reproducción tenga un reconocimiento oficial, debe de tener implantados los estándares oficiales internacionales como los

que ha desarrollado la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), y dentro de uno de los estándares que se pueden considerar para la asistencia clínica en la atención a parejas estériles está la ISO 9001 y a nivel nacional, la norma española UNE 179007 sobre sistemas de gestión de la calidad en laboratorios de reproducción asistida.

La nueva Norma UNE 179007, creada por iniciativa de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (Asebir) y certificada por AENOR, es una ampliación especializada de la Norma ISO 9001 de Sistemas de Gestión de la Calidad, con la que se busca crear normas sectoriales y unificar criterios para los laboratorios de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

Existe también la certificación por parte de un agente externo, según el Real Decreto-Ley 9/2014 que transpone a nuestro marco jurídico las directivas europeas sobre calidad y seguridad en las donaciones de gametos; Por lo tanto, es obligatorio que cada laboratorio, centro y/o banco, tenga implantado un Sistema de Gestión de Calidad; Con las certificaciones anteriores, se permite que los centros que se dedican al campo de la Reproducción asistida, generen crecimiento científico a través de las nuevas tecnologías, una mejora en la eficiencia a través de la estandarización, ser referente en calidad asistencial, conseguir la máxima satisfacción del paciente, aumentar la formación y motivación del empleado a través de una mejora continua y por último, garantizar la calidad del servicio mediante el cumplimiento de la legislación.

Por todas las razones anteriores, la acreditación proporciona cierta "tranquilidad" a los pacientes, usuarios clínicos y proveedores, el hecho de que un laboratorio cumpla las normas de organización y funcionamiento que le permitan proporcionar un servicio de alta calidad.

La gestión de un sistema de calidad debe de estar detallada en un Manual de Calidad, el cual contiene información acerca de todas las actividades que se realizan en un laboratorio y la política del control de calidad de la empresa, registro de procesos desarrollados en el laboratorio y sus responsables.

También, deben de existir indicadores de calidad que permitan analizar si los procedimientos se realizan con cierta destreza y el resultado esperado. El grupo de interés de de Calidad de Asebir diseñó un manual de indicadores de calidad en el laboratorio de embriología donde se destacan los indicadores de calidad considerando tres diferentes niveles: óptimo, deseable o mínimo para cada indicador (con un intervalo de confianza del 95%). (Castila et al., 2016).

Cuando el valor del nivel del indicador sea inferior al estándar deseable, se considera que el centro no alcanza los niveles de calidad deseables recomendados por Asebir para ese indicador específico; De tal manera que se debe de reflexionar, estudiar y valorar cada uno de los procedimientos para mejorar este indicador de calidad en el laboratorio de embriología.

Ética e investigación

En este aspecto, se deben de seguir los códigos deontológicos de las sociedades científicas y colegios profesionales, así como las recomendaciones establecidas por los comités de ensayos clínicos, ética e investigación autonómicos y locales.

Seguridad y Riesgos laborales

En cada laboratorio y centro de trabajo, es necesario instaurar un plan de Seguridad y prevención de riesgos laborales y se deben de seguir atentamente las siguientes recomendaciones:

- Todos los procedimientos se deben de realizar en condiciones asépticas

(lavado frecuente de manos con jabón o detergente adecuado tanto al entrar como al salir del laboratorio).

- La ropa que se debe de usar dentro del laboratorio es específica (pijama, gorro, mascarilla, guantes desechables, zuecos). Para circular fuera del laboratorio se recomienda el uso de otro par de zuecos.
- Además, se debe de tener en cuenta ciertos requisitos: Prohibido la utilización de cosméticos, colonias y perfumes. No se permite comer, fumar, masticar chicle, almacenar comida o bebida.
- Todo material biológico deberá ser tratado como potencialmente infeccioso. El material utilizado debe ser estéril y de un solo uso.
- En el laboratorio debe de haber dos tipos de bolsas de basura: una autoclavable para todos los desechos biológicos, placas tubos etc. y otra donde se colocarán materiales de papel, cartón y plástico. Los residuos biológicos y muestras peligrosas que van a ser incinerados fuera del laboratorio deben ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo.

La manipulación de muestras debe ser de forma individual.

Otras recomendaciones a tener en cuenta son:

- El acceso al laboratorio es exclusivo para el equipo del laboratorio de FIV, personal de limpieza y personal autorizado (médicos, enfermeras, auxiliares); Las puertas del laboratorio deben de permanecer cerradas.
- Las superficies de trabajo se deben de limpiar diariamente, al iniciar y al finalizar la jornada.
- No es recomendable colocar papel o libros en la zona de trabajo. El laboratorio debe permanecer limpio y ordenado.
- La utilización de gafas protectoras es de carácter obligatorio en la manipulación de muestras crioconservadas en el momento de

sacar o guardar pajuelas con ovocitos, embriones o muestras seminales.

- Pipetear con la boca no está permitido, en el mercado se encuentran disponibles capilares/pipetas para la manipulación de gametos, preembriones, medios de cultivo, etc.
- En el momento de utilizar material infeccioso, se deberá de utilizar cestillos o envases/tubos cerrados. En caso de rotura de tubo en el interior de la centrifuga, se deberán esperar 30 minutos después de la parada para la completa deposición de los aerosoles generados, en el caso de que el material biológico centrifugado pudiera presentar agentes biológicos que se transmitan por vía aérea.
- En relación a los objetos punzantes y cortantes, las agujas hipodérmicas deben ser de un solo uso, y nunca se debe de volver a colocar la capucha a la aguja, deben de descartarse en contenedores especiales. (Castilla et al., 2003)

Es muy importante que cada laboratorio de FIV, cumpla con un plan de Seguridad y Riesgos laborales para evitar o solucionar accidentes ó incidentes que se puedan presentar.

2. RECURSOS HUMANOS

Para que un laboratorio de FIV funcione de forma adecuada y alcance los indicadores de calidad de Asebir comentados anteriormente, se debe de tener en cuenta la experiencia del personal del laboratorio de FIV. Este personal debe de estar formado por: director del laboratorio, supervisor del laboratorio, embriólogos, técnico de laboratorio (embriólogo técnico) y auxiliar administrativo en caso necesario.

Según las recomendaciones de Asebir y Eshre (European Society of Human Reproduction and Embryology), las clínicas que realizan 150 procedimientos al año, deben de tener como mínimo dos embriólogos, teniendo en cuenta que este número puede aumentar dependiendo del número de ciclos o de la complejidad de los mismos u otras actividades como son la gestión administrativa, control de calidad, formación, educación continuada, etc.

La aplicación de los controles de calidad se garantiza mediante resultados constantes en cada uno de los procedimientos basados en los Protocolos normalizados de trabajo (PNT).

Según sociedades tanto de índole nacional (Asebir) como internacional (Asrm (American Society for Reproductive Medicine), Eshre) (Practice Committee of ASRM., 2014, ESRHE Guideline Group., 2015), establecen una organización detallada de los integrantes del laboratorio) y sus funciones como se describen en la tabla 1.

Puesto que se debe de minimizar el riesgo de error en el laboratorio de FIV, se recomienda la figura del testigo, puede ser cualquier miembro del equipo, y se encargará de atestiguar los procedimientos realizados en el laboratorio de FIV.

Para la completa formación de un embriólogo clínico y su posterior desarrollo en el laboratorio de FIV, se deben de llevar a cabo ciertos requisitos, según procedimiento, siguiendo las recomendaciones del grupo IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad) (De los Santos et al., 2013) que se describen en las tablas 2 y 3.

Para subsanar la variabilidad en los resultados clínicos de forma individual, es necesario que cada embriólogo conozca sus propios resultados según cada uno de los siguientes procedimientos: punciones, capacitación espermática, ICSI, evaluación de la fecundación, eclosión asistida, selección de embriones para transferir, transferencia embrionaria y criopreservación. Esta información se puede valorar como un control de calidad interno.

Para la implantación de un sistema de calidad, es obligatorio participar en el control de calidad externo de laboratorio de reproducción que ofrece Asebir, el cual es una herramienta que permite controlar la calidad del laboratorio de FIV. Consiste en la realización de un análisis sobre una misma muestra de control, donde los resultados de cada laboratorio

	Titulación académica	Experiencia	Titulación superior	Responsabilidades
Director Laboratorio FIV	Biología, Medicina, Veterinaria, etc.	6 años	Máster/ doctorado Certificación Eshre en embriología clínica o similar	* Conocimientos y Destreza en TRA * Comunicación director clínica * Promover mejora continua del equipo (cursos, actualizaciones) * Toma de decisiones * Selección de materiales, equipos y procedimientos * Implementación de un programa de Control de calidad y Prevención de riesgos laborales * Implementación de indicadores de calidad * Comunicación de resultados clínicos y eventos adversos * Participación en programas de investigación
Supervisor Laboratorio	Biología, Medicina, Veterinaria, etc.	3 años	Máster/ doctorado Certificación Eshre en embriología clínica o similar	* Mantener la organización eficiente del trabajo diario de cada una de sus áreas, mejora continua, formación continuada de miembros del departamento y estudiantes
Embriólogo	Biología, Medicina, Veterinaria			* Ejecución de los protocolos normalizados de trabajo (PNT), participación en la práctica diaria, comunicación y organización y la contribución a las decisiones clínicas que se toman en el laboratorio * Coordinar las tareas diarias de FIV * Coordinar el programa de mantenimiento de equipos, siendo el responsable en todo lo relacionado con instalación, funcionamiento y mantenimiento de los equipos del laboratorio * Coordinar lo relacionado con el área de criobiología (puesta en marcha de los procedimientos de criopreservación, organización del banco de preembriones y ovocitos) 7
Embriólogo técnico/ Técnico laboratorio	Técnico de laboratorio Diplomatura universitaria en enfermería			Ayudar en el desarrollo de la tarea diaria del embriólogo. (Verificación de temperaturas de superficies calefactadas, bancos de ovocitos y preembriones, temperatura y CO2 de incubadores, medición de pH de los medios de cultivo, valoraciones espermáticas, limpieza del laboratorio, etc.).
Personal administrativo	Auxiliar administrativo			* Desempeño de tareas administrativas propias de su cargo. (Llamadas telefónicas a pacientes para informar fecundación, desarrollo embrionario, fecha de transferencia * Gestión de preembriones congelados, etc.)

Tabla 1. Requisitos para el personal del laboratorio de FIV

son informados comparándolos con los demás laboratorios participantes. Adicionalmente, cada laboratorio participante debe realizar catalogaciones embrionarias, previamente realizadas por el grupo de interés de Embriología de Asebir. (Ruiz de Assin et al., 2009).

3. RECURSOS FISICOS

Diseño del laboratorio de FIV

Para que en un laboratorio en el que se desarrollen técnicas de fecundación in vitro de manera óptima, se deben de tener ciertos requisitos:

- Localización del laboratorio

Este es uno de los requisitos más importantes para tener en cuenta cuando se pretende crear un centro de RA, debido a que la calidad del aire es relevante en el manejo de gametos y embriones; La calidad del aire se

modifica de forma considerable, dependiendo de la ubicación geográfica del laboratorio, lo que quiere decir que un laboratorio ubicado en un pequeño pueblo lejos de la contaminación, cerca de bosques o parques, conservará una mejor calidad de aire que aquel que esté localizado en las zonas céntricas de las grandes ciudades. (Calderón y Costa et al., 2015). También se debe tener en cuenta un apropiado sistema de ventilación con el objetivo de aislar y proteger de la contaminación externa a los gametos y embriones humanos.

La primera recomendación sería la medición de compuestos volátiles orgánicos, del inglés VOCs (volatile organic compounds) en el aire exterior. Una vez analizados los resultados, se procede al diseño del sistema de ventilación con la ayuda de ingenieros, para cubrir las necesidades del sitio escogido. El laboratorio de FIV no debe de compartir el sistema de ventilación con el quirófano, debe de ser totalmente independiente.

Recientemente se están comercializando módulos prefabricados SMS (superficies de minerales sólidos) para la construcción de laboratorios de FIV, ofreciendo ventajas como las de tener los acabados antibacterianos, buen diseño, tamaño, alta flexibilidad y máxima asepsia. Otra ventaja es que son bacteriostáticos, no porosos y fáciles de limpiar - desinfectar. (Calderón y Costa. 2015).

Tanto gametos como embriones, deben de permanecer fuera de los incubadores el mínimo tiempo posible, por lo que

el diseño del laboratorio debe de garantizar un flujo de trabajo óptimo, reduciendo las distancias entre los diferentes puestos de trabajo.

La guía de buenas prácticas de Eshre, (ESRHE Guideline Group., 2015) hace las siguientes recomendaciones:

- Materiales

Los materiales utilizados en la construcción del laboratorio como pintura, madera, muebles de laboratorio, deben ser apropiados para mantener los estándares de las salas blancas, minimizando la liberación de VOCs y toxicidad embrionaria.

- Sistema de ventilación

Se recomienda la instalación de un sistema de ventilación independiente, con filtros VOCs, HEPA (high efficiency particle air) y filtros convencionales. Adicionalmente el uso de un sistema de luz ultravioleta debe ser incluido al final del sistema de ventilación para que exista una eliminación eficiente de VOCs y una mejor protección contra posible contaminación de hongos, virus y bacterias.

- Muebles- Equipos

El uso excesivo de muebles dentro del aérea del laboratorio de FIV no es recomendable. Las superficies y estanterías deben de ser de acero inoxidable o de cristal.

La localización de equipos de laboratorio es muy importante tenerla en cuenta, ya

que una unidad de trabajo, consiste en una mesa anti vibratoria con un microscopio invertido, adaptado a un sistema de micro manipulación, una cabina de flujo laminar vertical con la superficie calefactada y un incubador de trabajo.

- Acceso restringido-Acceso

Solamente pueden acceder al laboratorio personal autorizado: embriólogos y técnicos en primera instancia. El personal de limpieza podrá entrar al área del laboratorio a primera y última hora de la tarde.

Es altamente recomendable establecer un sistema de acceso limpio tanto para el personal como para los materiales a utilizar (cortinas de aire).

- Vestuarios y área de esterilización

Tanto los vestuarios como el área de esterilización deben de estar en otra zona del centro de reproducción.

- Trabajo administrativo

El área disponible para el trabajo administrativo debe de estar fuera del área del laboratorio. En este espacio se destina a toda la información relacionada con las instrucciones de los equipos, certificados y revisiones de los equipos calibrados, verificados o revisados.

Los PNT son documentos donde se detallan de forma pormenorizada todos los pasos de los procedimientos que se realizan en un laboratorio de FIV, incluyendo los posibles problemas,

	Búsqueda Ovocitos (casos)	Evaluación CCO (casos)	Inseminación FIV (casos)	Fecundación (casos)	Decumulación (FIV) (casos)	Observación D2, D3, Blastocisto (embriones)
Observación	50	50	12	15	15	100
Realización compartida	10	50				
Realización autónoma	10		12	30 FIV 50 ICSI	30	50

Tabla 2. Procedimientos para embriólogos en formación

	Transferencia embrionaria (casos)	Criopreservación (casos)	Decumulación ICSI (casos)	ICSI (casos)	Cultivo secuencial (casos)
Observación	50	50	15	25	25
Realización compartida			25		10
Realización de ensayo	25	30			
Realización autónoma	10		150 ovocitos	100 ovocitos	30

Tabla 3. Procedimientos para embriólogos en formación

errores que puedan surgir con sus correspondientes soluciones. (De los Santos et al., 2013). Estos PNT pueden permanecer en esta zona o de manera informática. Todos los PNT deben de ser lo suficientemente claros, como para que un biólogo recién incorporado o ajeno al laboratorio, pueda desarrollar el procedimiento según PNT sin necesidad de tener ninguna duda al respecto. Los PNT deben de ser revisados y actualizados de forma anual si fuera necesario.

- Pruebas especiales

Si el laboratorio dispone de un sitio destinado a la realización de pruebas

especiales, puesto donde se utilizan fijadores y sustancias tóxicas, una cabina extractora es necesaria.

- Distribución del laboratorio de FIV

El diseño del laboratorio de FIV debería incluir principalmente tres salas o habitaciones; una para criopreservación, una segunda para la preparación de muestras seminales y una tercera para el trabajo de embriología.

En caso de realizar pruebas especiales, se recomienda otra sala con cabina extractora.

Calidad del aire en el laboratorio de FIV

Para optimizar las condiciones ambientales, el aire del laboratorio, debe pasar por filtros HEPA y control de VOCs. Y para minimizar la contaminación del aire, la presión debe ser positiva.

Los procedimientos que involucran a la manipulación de gametos y embriones deben de realizarse en un ambiente controlado siguiendo las normativas europeas; De tal manera, que los laboratorios de FIV deben de proporcionar un ambiente seguro, libre de patógenos, sin tóxicos y libre de VOCs convirtiéndose en una sala blanca.

	0.1µm	0.2µm	0.3µm	0.5µm	1µm	1µm
Clase ISO 1	10	2	0	0	0	0
Clase ISO 2	100	24	10	4	0	0
Clase ISO 3	1.000	237	102	35	8	0
Clase ISO 4	10.000	2.370	1.020	352	83	0
Clase ISO 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
Clase ISO 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
Clase ISO 7	10.000.000	2.370.000	1.020.000	352.000	83.200	2.930
Clase ISO 8	100.000.000	23.700.000	10.200.000	3.520.000	832.000	29.300
Clase ISO 9	1.000.000.000	237.000.000	102.000.000	35.200.000	8.320.000	293.000

Tabla 4. Clasificación ISO según concentración y tamaño de las partículas

Según la Norma ISO 14644-1, se define como sala blanca, una habitación en la cual, la concentración de partículas aéreas está controlada. Esta habitación está construida para minimizar la introducción, generación y retención de partículas en su interior y, controlar parámetros relevantes como temperatura, humedad y presión. Según el tamaño y concentración de partículas, se establece una clasificación que se describe en la tabla 5.

De acuerdo a la directiva de Células y Tejidos de la Unión Europea (ETCD), el procesado de células y tejidos se debe realizar según Good Manufacturing Practice (GMP) en un ambiente de grado A pero con fondo ambiental de calidad tipo D. Además, en caso que sea perjudicial utilizar un grado A, algunos procesados se podrían realizar en un ambiente grado D. (5)

Equipamiento del laboratorio

El laboratorio debe de tener los equipos necesarios para el desarrollo de las técnicas que se van a llevar a cabo en un número adecuado dependiendo de la carga de trabajo.

Se hace mención especial a los incubadores debido a su relevancia, su número es crítico, debido a que está relacionado con el número de ciclos que se realicen en el centro de RA.

Entre menos oportunidades se abran las puertas de los incubadores convencionales, las condiciones de temperatura, CO₂ y pH serán más estables. Existen en el mercado otro tipo de incubadores disponibles, tipo time lapse, de sobremesa, donde la recuperación de los parámetros de temperatura, pH y de gases CO₂/O₂ es más rápida.

Cada uno de los equipos debe de tener su manual de instrucciones y deben de mantenerse localizados para ser revisados en determinados momentos como averías, calibración etc. De igual forma, cada uno de los equipos debe de tener un rango de uso y estar registrado en su ficha de mantenimiento de equipos. La temperatura y CO₂ de los incubadores se deben de verificar de forma rutinaria, así como la temperatura de las superficies calefactadas. También se deben de verificar diariamente las temperaturas de neveras, congeladores y bancos de ovocitos/embriones como se describe en la tabla 4. Sus mediciones deben de permanecer dentro de un rango aceptado y registrados. Cualquier incidencia como alguna medida fuera del rango debe de ser observada y corregida.

En el momento que un equipo no funcione correctamente mediante comprobación del servicio técnico, se debe de dar de baja y debe de quedar

registrado en su ficha mediante una etiqueta colocando "fuera de uso" para evitar su utilización.

Para mantener una trazabilidad en los resultados clínicos del laboratorio, se recomienda como mínimo una vez al año realizar una parada técnica que consiste en limpiar a fondo el laboratorio de FIV, incluyendo paredes, techos y suelos. Los equipos también se deben de limpiar de una forma pormenorizada y aprovechando esta situación, el servicio técnico debe acudir para hacer las correspondientes calibraciones, verificaciones o revisiones de los equipos.

- Calibración/Verificación de equipos

Los equipos críticos tales como incubadores y banco de embriones, deben ser calibrados/verificados por lo menos una vez al año. También deben de ser verificadas cabinas y centrifugas. Igualmente, los microscopios y lupas deben ser revisados de forma anual.

Todas las calibraciones, verificaciones se deben de realizar con aparatos de medidas que previamente estén calibrados y aportar esta información al personal responsable de mantenimiento de equipos. Los informes de calibración deben ser realizados por entidades reconocidas en este campo. Debe de

EQUIPO	Tipo de medida externa	Frecuencia medición
Incubadores	Temperatura y CO ₂	Diaria
Superficies calefactadas de cabinas y microscopios	Temperatura	Diaria
Congeladores	Temperatura	Diaria
Refrigeradores	Temperatura	Diaria
Bancos de ovocitos/embriones	Temperatura	Diaria
Bloques calefactados	Temperatura	Diaria
Pipetas automáticas	Volumen	Semestral/Anual

Tabla 5. Parámetros y frecuencia de verificación para la supervisión de los equipos de laboratorio

existir un registro donde consten todas las calibraciones/verificaciones/revisiones de los equipos, con sus correspondientes certificados de calibración.

- Gases

Las bombonas de los gases deben de estar localizadas fuera del área del laboratorio de FIV dotado de un sistema automático de recambio.

- Superficies calefactadas

El laboratorio de FIV debe de tener instaladas en las cabinas un sistema de calefacción para la manipulación de los gametos y embriones, excepto cuando se realizan procedimientos de crioconservación ovocitaria y embrionaria. Los microscopios también deben mantener este sistema de calefacción.

- Medidor de pH

Es importante realizar la medición del pH de los incubadores de forma semanal, ya que es una herramienta fundamental para correlacionar las medidas de CO₂.

Durante los procedimientos de rutina y el procesamiento de muestras (gametos, embriones), éstos son especialmente sensibles a los cambios de pH, que pueden conducir a una alteración en el pH interno (pHi) y a un impacto en la función del desarrollo posterior. La medición de pH es un parámetro ambiental, no requiere estricta atención en la puesta a punto, pero es muy susceptible a los cambios.

Tradicionalmente el pH externo (pHe) es el resultado del balance entre las concentraciones de CO₂ en el medio de cultivo y la cantidad de bicarbonato en el medio, o sea que el pH de los medios de cultivo depende directamente del porcentaje de CO₂ y de la concentración de bicarbonato sódico en el medio (de 17-25 mmol/l) (De los Santos et al., 2013).

El pHi regula una variedad de procesos celulares tales como: Activación de la concentración enzimática, división, comunicación celular y diferenciación, Transporte de membranas y Síntesis de proteínas, elementos del citoesqueleto y los microtúbulos. El pHe puede variar de medio a medio. Estudios comparativos

han evidenciado pequeñas variaciones de pHe, y por ello la recomendación de un rango aceptable es de 7,2-7,4. (Swain., 2010)

- Sistemas de alarma

Todos los equipos críticos (incubadores y bancos de ovocitos/preembriones), deben de estar permanentemente monitorizados y tener sistema de alarma cuando las mediciones estén fuera de rango. También se deben de incluir sensores de temperatura y humedad de todas las áreas del laboratorio. Los valores de la temperatura de un laboratorio son: 21-24°C y la humedad relativa de 45-55%. Debe de existir un sistema automático en los equipos críticos que se active en estados de emergencia.

Sala de crioconservación

En la sala de crioconservación donde se encuentran los criobancos deben de tener una adecuada ventilación y alarmas que detecten bajas concentraciones de oxígeno, haciendo parte de un sistema de seguridad.

Como ya se había comentado anteriormente, los criobancos están catalogados como equipos críticos, por lo tanto, deben de estar monitorizados de una forma permanente y tener un sistema de alarma cuando las mediciones se encuentren fuera de rango.

Para la manipulación de las muestras en los criobancos, es obligatorio el uso de guantes y gafas como medidas de protección.

Sistema de identificación de pacientes y trazabilidad de sus células reproductivas

Este es un aspecto muy importante en un laboratorio de TRA, por lo que cada laboratorio debe de tener un sistema eficaz y preciso para identificar, rastrear y localizar tanto ovocitos/muestras seminales como embriones de forma exclusiva durante cada uno de los procedimientos que se van a llevar a cabo.

En el mercado se encuentran disponibles sistemas informáticos de seguridad y trazabilidad de muestras biológicas en el laboratorio (Witness/"testigo").

Este sistema utiliza la radiofrecuencia para detectar las muestras. Es capaz de identificar los chips informáticos, que previamente se asignan a la pareja o a la paciente cuando comienza un tratamiento. Sirve para asegurar y controlar en todo momento la trazabilidad de los óvulos, del semen y de los embriones de cada pareja.

Material fungible

Todo el material que es utilizado en los laboratorios de RA (capilares, pipetas, jeringas, placas de cultivo, tubos, etc.) debe de pasar por un control de calidad que recibe el nombre de control biológico de embriotoxicidad para poder estar en contacto con gametos y embriones humanos. La mayoría de los plásticos son tóxicos o liberan VOCs, afectando al desarrollo embrionario, por esta razón se recomienda que todos los plásticos que entren en contacto con gametos y embriones, sean testados con ensayos con embriones de ratón (mouse embryo assay MEA) para comprobar que el desarrollo embrionario no se vea afectado.

De la misma manera, se sugiere airear todos los plásticos como mínimo 48 horas previas al contacto con gametos y embriones.

En la actualidad, se encuentran varios tipos de test para comprobar la embriotoxicidad de los productos utilizados en el laboratorio de FIV. Los más comunes son: prueba de supervivencia espermática y la prueba con embriones de ratón. (De los Santos et al., 2013; Calderón et al., 2013). Estas pruebas consisten en la exposición del material fungible o medio de cultivo que se desea probar. En la prueba de supervivencia espermática, los espermatozoides son capaces de mantener su movilidad en condiciones de cultivo adversas y la prueba con embriones de ratón (MEA) donde se estudia la probabilidad de la evolución embrionaria de ratones desde 1-2 células hasta el estadio de blastocisto. Se considera que la prueba se supera el 80% de los embriones llegan al estadio de blastocisto expandido con una adecuada masa celular interna. (Gardner et al., 2005).

Otra prueba sensible y específica disponible es Ensayo Amebocitos Lysate (LAL) es para detectar la presencia de niveles peligrosos de endotoxinas en todo tipo de materiales, medios de cultivo, productos o equipos utilizados en el laboratorio de FIV.

Cada lote de medio de cultivo debe de tener una certificación de pH, osmolaridad, test de nivel de endotoxina, ensayos con embriones de ratón (MEA), supervivencia espermática, ensayo LAL Amebocitos Lysate. Además, cada lote del material utilizado en cada paciente (capilares, diferentes medios de cultivo, cánulas de transferencia embrionaria, placas, etc.) debe de estar registrados en la ficha de cada una de ellas con el objetivo de tener la facilidad de trazabilidad en el momento de identificar un determinado problema.

El material fungible utilizado no debe ser reutilizado bajo ningún concepto, debe ser siempre de un solo uso.

CONCLUSIONES

Para tener un verdadero éxito en los resultados clínicos en el ámbito de la medicina reproductiva, se deben de tener en cuenta parámetros como: organización general, recursos humanos y recursos físicos.

Dentro del marco de la organización general es importante la implementación de un sistema de gestión de calidad, el desarrollo de principios básicos de ética, una práctica correcta de los códigos deontológicos determinadas por las sociedades científicas y un plan de seguridad y prevención de riesgos laborales.

Relacionado con los recursos humanos, el equipo del laboratorio de FIV, compuesto por director, supervisor y embriólogo /técnico, deben de tener la suficiente experiencia para la toma de decisiones en el área de la embriología. La actualización permanente mediante la asistencia a cursos, congresos o talleres es una de las claves fundamentales para una mejora continua.

Los PNT se deben de cumplir de forma minuciosa, así se optimizan los controles de calidad en los diferentes procedimientos, al igual que cada embriólogo debe de conocer sus propios resultados clínicos como control de calidad interno.

La participación en controles de calidad externo (Asebir), es obligatoria, siguiendo la UNE 179007.

Desde el punto de vista de recursos físicos, es relevante la ubicación del centro de RA, control de VOCs y sistema de ventilación con filtros HEPA.

El laboratorio de FIV debe de tener al menos una parada técnica en el año para la limpieza, revisión, verificación/calibración de los equipos de laboratorio y limpieza general del laboratorio de FIV.

Las verificaciones de parámetros como niveles de CO₂ y temperatura tanto en incubadores como en superficies calefactadas, se deben de realizar de forma rutinaria. De igual forma se debe de verificar la temperatura de los bancos de ovocitos y embriones.

REFERENCIAS

Calderón G, Costa N. Guidelines for the design of an IVF Laboratory. *Fertility magazine* 2015; 18:52-53.

Calderón G, Martín M, Esbert M, Ballesteros A, Remohí J. Pruebas biológicas de control de calidad en el laboratorio de embriología clínica En: Remohí J, Cobo A, Prados N, Pellicer A. Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Madrid 2013:103-106.

Castilla JA, Boada M, Expósito A, Luna C, Núñez R, De los Santos MJ. Recomendaciones sobre recursos humanos y físicos en el laboratorio de reproducción humana asistida. En ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica 2006:9-12.

Castilla JA, Magán R, García-Peña ML, Mendoza JL, Ortiz A, González E, Llamas M, Peña Taveras MC. Generalidades sobre seguridad biológica en el laboratorio. En Seguridad biológica en el laboratorio de reproducción asistida 2003: 16-18.

Castilla J, Martos A Indicadores de calidad en el laboratorio de embriología: definición y especificaciones. En ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica 2016:34-60.

De los Santos MJ, Albert C, Viloria T, Romero J. Control de calidad en los laboratorios de embriología clínica: procedimientos normalizados de trabajo el laboratorio: ambiente del laboratorio, equipos y material fungible En: Remohí J, Cobo A, Prados N, Pellicer A. Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Madrid 2013:91-93.

De los Santos MJ, Gámiz P, Galán A, Romero P. Control de calidad en los laboratorios de embriología clínica: recursos humanos En: Remohí J, Cobo A, Prados N, Pellicer A. Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Madrid 2013:83-89.

De los Santos MJ, Gámiz P, Galán A, Romero P. Control de calidad en el laboratorio: ambiente del laboratorio, equipos y material fungible En: Remohí J, Cobo A, Prados N, Pellicer A. Manual Práctico de esterilidad y reproducción humana. Madrid 2013:95-101.

ESHRE Guideline Group on good practice in IVF labs. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories 2015:3-6.

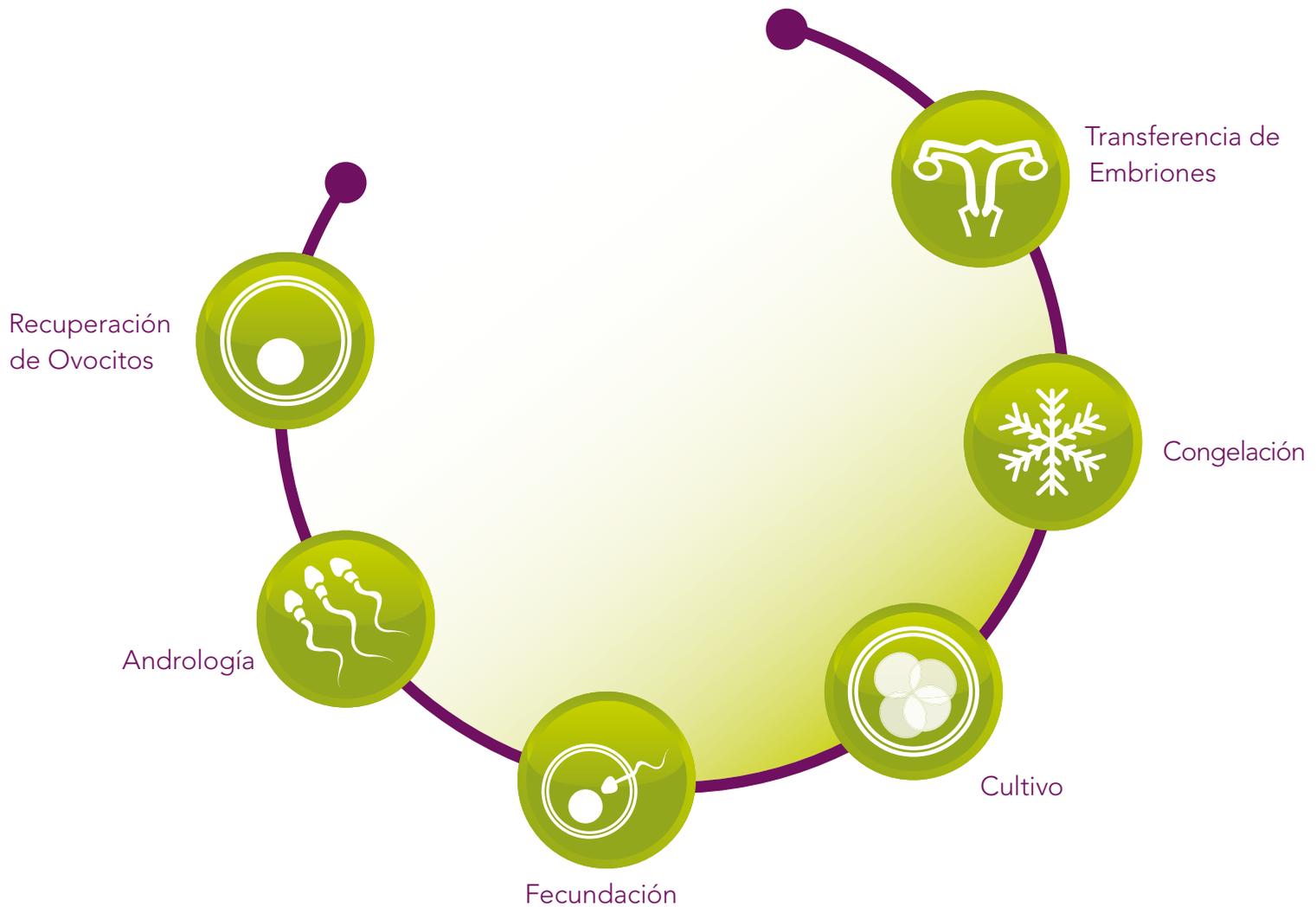
Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. Gardner DK1, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. *Semin Reprod Med*. 2005; 4:319-324.

Practice Committee of the American Society for Reproduction Medicine, Practice Committee of the Society for Assisted Reproduction Technology and Practice Committee of the Society of Reproductive Biologists and Technologists. Recommended practices for the management of embryology, andrology and endocrinology laboratories *Fertil Steril* 2014; 102:960-963.

Ruiz de Assín R, Clavero A, Gonzalvo MC, Ramírez JP, Zamora S, Fernández A., Martínez L, Castilla JA. Comparison of methods to determine the assigned value in an External Quality Control Programme for embryo evaluation. *Reprod Biomed Online* 2009; 19:824-829

Swain J. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo Quality *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 21:6- 16.

ORIGIO- Su proveedor de soluciones para FIV



ORIGIO es, desde 1987, líder mundial en proveer soluciones para todo tipo de Técnicas de Reproducción Asistida. Mediante la investigación y la innovación, ORIGIO tiene como objetivo ofrecer productos y servicios a profesionales de la Reproducción Asistida en cada paso del proceso de la Fecundación In Vitro. Junto con nuestros clientes ayudamos a hacer realidad el sueño de muchas parejas en más de 100 países.

ORIGIO pertenece al grupo CooperSurgical. Lea más en www.origio.com.



origio

a CooperSurgical Company

Origio Medicult Espana S.L

C/ Platón 6 • 08021 Barcelona • España

Tel: 93 199 81 18 or 93 199 81 19 • Fax: 93 362 36 11

E-mail: barcelona@origio.com • www.origio.com

CUADERNO DE ANDROLOGÍA CLÍNICA



Apreciados compañeros,

Finalmente ya ha sido publicado el primer Cuaderno de Andrología Clínica, proyecto realizado entre dos asociaciones hermanas ASEBIR y ASESAs. Desde el inicio del proyecto quedaron establecidas algunas premisas importantes que pensamos se han cumplido:

- Involucrar a dos sociedades científicas para tratar un tema importante dentro de la Andrología Clínica
- Contar con la ayuda de expertos que se dedican al tema y realizar un enfoque desde el punto de vista del andrólogo
- Dar la oportunidad a socios de la base de GIA a participar en un proyecto así

Hasta hace relativamente poco, existía un conocimiento limitado sobre los factores de riesgo que pueden afectar a la fertilidad del hombre. Por este motivo, los profesionales que nos dedicamos a la Andrología hemos sumado esfuerzos con objeto de ser capaces de aumentar dicho conocimiento, que en ocasiones será decisivo para mejorar las expectativas reproductivas de nuestros pacientes. No es una tarea fácil, y por eso la colaboración de todos es fundamental. Hoy en día además de las pruebas diagnósticas rutinarias, se hace mandatorio considerar la exposición a contaminantes ambientales, y tener en cuenta los hábitos de vida de nuestros pacientes para poder establecer pautas de actuación.

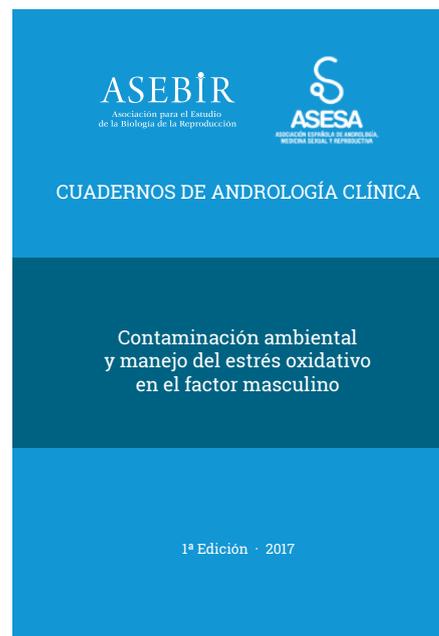
Con este cuaderno se ha dado un pequeño paso y aunque queda mucho por hacer, entre todos se ha conseguido editar un manual que abarca distintas temáticas relacionadas con factores ambientales: disruptores endocrinos, contaminación atmosférica, campos electromagnéticos, hábitos de vida, y como no podía ser de otra manera, se aborda el factor masculino y el estrés oxidativo, así como el sistema antioxidante y la suplementación exógena.

En el último capítulo se recogen las recomendaciones que pensamos son importantes transmitir adecuadamente al paciente, y también se detalla información sobre los distintos tipos de exposiciones que puede tener el paciente, así como el conocimiento de los principales hábitos de vida. En muchas ocasiones, el hombre no es consciente de los efectos que pueden tener estos factores para su salud reproductiva, y como ha sido publicado recientemente, el hombre sólo es capaz de reconocer el 51% de los factores de riesgo (Daumler et al., 2016).

Este proyecto se presentó durante el XVIII Congreso Nacional de ASESAs, celebrado en Cartagena en abril de 2017, donde tuvo mucha aceptación y desde donde hay apoyo para dar continuidad a proyectos como éste o formar nuevos equipos de trabajo. Pronto estará disponible desde la web y será distribuido por Laboratorios Angelini, a quienes agradecemos su colaboración.

Os invitamos a disfrutar de la lectura de este manual, esperamos que os guste!.

Cristina González y Rafael Lafuente.



¡YA SOMOS MÁS DE 1000!

Desde que ASEBIR se creara en 1993 con la idea de agrupar a los profesionales que trabajaban en el ámbito de la Biología de la Reproducción en España, “ha llovido mucho”. No sin esfuerzo y gracias al trabajo que han desarrollado las distintas juntas directivas que se han sucedido a lo largo de estos años, lo que comenzó siendo el sueño de apenas un centenar de personas, se ha convertido en una asociación de más de 1000 profesionales (la gran mayoría Licenciados o Doctores en Ciencias Biomédicas) que trabajan como Embriólogos Clínicos en laboratorios de Reproducción Humana Asistida y Genética Reproductiva, tanto en el ámbito público como privado, o como profesionales que desde la Universidad realizan labores de investigación.

ASEBIR es una asociación cuya opinión se tiene en cuenta. Somos miembros de pleno derecho de la COMISIÓN NACIONAL DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA del Ministerio de Sanidad y Política Social, formando parte de su comité permanente; de la CONFEDERACIÓN de SOCIEDADES CIENTÍFICAS de ESPAÑA (COSCE). Hemos participado como asociación en Comisiones Ministeriales, elaborando la cartera básica de servicios mínimos del SNS, así como en Comisiones Autonómicas como la que redactó la propuesta de acreditación y autorización de laboratorios de la Comunidad Autónoma de Madrid. También hemos participado conjuntamente con AENOR en el Grupo de Trabajo AEN/CTN 179/GT9 “Reproducción asistida” para la elaboración de una norma UNE, colaboración que propició la publicación de una nueva norma específica para los Laboratorios de Reproducción Asistida, UNE 179007:2013 el 3 de diciembre de 2014.

Durante todo este tiempo hemos mantenido la misma ilusión, ganas de trabajar y las mismas expectativas de fomentar el espíritu asociativo en un colectivo, cuya labor dentro del área de la Reproducción Asistida, tiene cada vez más peso e importancia en nuestra sociedad.

Felicidades a todos y 1000 gracias!



ASEBIR EN TWITTER Y LINKEDIN

ASEBIR, ahora también en Twitter y LinkedIn. Síguenos y recibe las últimas noticias a golpe de click!!

ASEBIR, en su afán de llegar a todos los socios y a todos los rincones, abre un nuevo canal en Twitter y LinkedIn. Buscamos la comunicación rápida y directa, para acercaros las últimas novedades científicas y poner a vuestra disposición una nueva plataforma para opinar y discutir sobre los temas de actualidad.

En ellas, ASEBIR os mantendrá informados sobre congresos, eventos científicos, así como de nuestros cursos y noticias de última de hora.



LINKEDIN

<https://www.linkedin.com/in/asebir-asociación-científica-2667a742/>



TWITTER

<https://twitter.com/ASEBIRreprod>

GANADOR DE LA BECA "AULA JOVEN" ASEBIR 2017

Una edición más queremos felicitar a todos los jóvenes que han participado en el Aula Joven de la revista ASEBIR por los artículos enviados, y agradecer su esfuerzo.

En este periodo (junio 2016 - junio 2017) se han publicado un total de 7 artículos que optaban a una beca Aula Joven consistente en una inscripción gratuita al IX Congreso de ASEBIR, que tendrá lugar el próximo mes de noviembre en Madrid.

La ganadora ha sido **Elisa Álvarez Socias**, estudiante de postgrado y Embrióloga en Create Fertility (Londres) con el artículo "**Enfermedades mitocondriales. Fecundación *in vitro* triparental**".

Los otros artículos que optaban al premio en esta convocatoria han sido:

- Influencia de los eventos citocinéticos en la calidad embrionaria convencional.
Autor: Nuria Zopeque
- Vitricación de espermatozoides.
Autor: Jose Gabriel Descals
- ¿Existen diferencias en el sex-ratio de los niños nacidos tras una TRA? Estudio retrospectivo en el CHGUV.
Autor: Rubén Dasí Crespo
- FIV de co-incubación corta vs FIV convencional
Autor: Iris Martínez Rodero
- Problemas bioéticos del anonimato vs no anonimato en la donación de gametos para la RHA
Autor: Laia Selva Pareja
- Ventajas e inconvenientes de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto y d+3 en la reproducción asistida.
Autor: Gabriela González Iglesias

¡Gracias a todos por vuestra participación!

Aprovechamos la ocasión para animar a los socios junior de ASEBIR a seguir enviando artículos a la sección Aula Joven.

Vocalía de Publicaciones.

IX CONGRESO ASEBIR. MADRID 2017



FECHAS

15, 16 y 17 de noviembre de 2017.

SEDE

Centro de Convenciones Hotel Meliá Castilla Madrid (C/ Rosario Pino – Madrid 28020)

WEB

<http://www.congresoasebir.es>

COMITÉ CIENTÍFICO Y ORGANIZADOR LOCAL

Presidenta Comité Científico y Organizador Local:
Yolanda Mínguez Royo.

VOCALES COMITÉ CIENTÍFICO:

- Vicente Badajoz Liébana
- Montserrat Boada Palá
- Yolanda Cabello Vives
- Inmaculada Campos Ramírez
- Jorge Cuadros Fernández
- Cristina González Ravina
- Mark Grossmann i Camps
- M^a Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
- M^a Dolores Lozano Arana
- José Muñoz Ramírez
- Rocío Núñez Calonge
- Nereida Ortiz Piñate
- Xavier Vendrell Montón

VOCALES COMITÉ ORGANIZADOR LOCAL:

- Antonio Alcaide Raya
- Manuel Ardoy Vilches
- Iñaki Arroyos Solaguren
- José Luis de Pablo Franco
- Elisa Escalante Bermúdez
- Carolina González Varea
- Miriam Iglesias Núñez
- Fernando Jesús Prados Mondéjar
- Sara Rafael Fernández
- Félix Rodríguez Juárez
- Luz Rodríguez Ramírez
- M^a José Torello Ybáñez
- Celia Villas Martín

COMITÉ DE HONOR

- Excm. Sra. D^a. Dolores Montserrat Montserrat. *Ministra de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*.
- Excm. Sra. D^a. Cristina Cifuentes Cuencas. *Presidenta de la Comunidad de Madrid*.
- Dr. D. Jesús Sánchez Martos. *Consejero de Sanidad de la Comunidad de Madrid*.
- Sr. Rector Magfco. D. Carlos Andradas Heranz. *Universidad Complutense de Madrid*
- Sr. Rector Magfco. D. Juan Fernando Galván Reula. *Universidad de Alcalá*
- Sr. Rector Magfco. D. José María Sanz Martínez. *Universidad Autónoma de Madrid*

CURSOS PRECONGRESO

En su compromiso con la Formación continuada ASEBIR organiza los siguientes Cursos la mañana del **15 de noviembre**, previos a la inauguración del IX Congreso:

- **FIRST JOINT MEETING ASEBIR & SIERR:** FROM DONOR TO RECIPIENT. FROM SPAIN TO ITALY
- **PRECONGRESS COURSE Nº 1:** CULTURE, CLASSIFICATION AND VITRIFICATION / DEVITRIFICATION OF HUMAN BLASTOCYSTS
- **CURSO PRECONGRESO Nº 2:** EL PAPEL DEL TÉCNICO EN LOS LABORATORIOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

AUSPICIOS CONCEDIDOS

Sociedad Española de Fertilidad (SEF)

Sociedad Española de Contracepción (SEC)

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

Colegio Oficial de Biólogos de la Comunidad de Madrid (COBCM)

PREMIOS Y GALARDONES

Las comunicaciones que según la valoración del comité científico, se presenten en formato oral optarán al **PREMIO ASEBIR-EMB 2017**. El premio estará dotado con diploma acreditativo y la cantidad de **5.000 €** por gentileza del Grupo Equipos Médico-Biológicos. El premio será entregado por el Director General de EMB, el Sr. Sergio Olivero Rigau y la Dra. Montserrat Boada Palà, presidenta de ASEBIR.

Las comunicaciones que sean aceptadas en formato Póster podrán optar al **PREMIO ASEBIR AL MEJOR PÓSTER 2017**. El premio estará dotado con diploma acreditativo y **600 €**. Los finalistas recibirán un certificado acreditativo. El premio será entregado por la Dra. Montserrat Boada Palà, presidenta de ASEBIR.

El **II PREMIO CRIO MERCK ASEBIR 2017**, promovido por Merck, se otorgará a la mejor comunicación científica en el ámbito de la criobiología aceptadas en el IX Congreso ASEBIR, en las que al menos uno de los autores sea miembro de ASEBIR. El premio estará dotado con **1.500 €** y será entregado por la Dra. Montserrat Boada Palà, presidenta de ASEBIR y por un representante de Merck.

Más información sobre los premios en <http://congresoasebir.es/asebir/premios-asebir>

SECRETARÍA TÉCNICA

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

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

E-mail: info@congresoasebir.es

BOLSAS DE VIAJE PARA ESTANCIAS EN EL EXTRANJERO

En la II Convocatoria para estancias en el extranjero fueron concedidas 3 bolsas de viaje, y ya ha concluido su estancia una de las becadas, Laura Abril Parreño.

Laura ha realizado su estancia en el Laboratorio de Medicina Reproductiva del Centro Biomédico de la Facultad de Medicina de Pilsen (República Checa). Su objetivo ha sido llevar a cabo el proyecto de investigación "Implicación del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) en la capacitación espermática".

Como resultado de su estancia nos ha remitido una interesante memoria que publicamos a continuación.

Animamos a todos los socios de Asebir interesados en estas estancias a seguir enviando sus solicitudes.

TESISVITA

Solución eHealth para Medicina Reproductiva

- Intuitivo
- Seguro
- Flexible
- Interoperable
- Escalable



Agendas
Facturación



Ttos. Fertilidad
Bancos



Historial clínico



Estadísticas



IMPLICACIÓN DEL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA (UPS) EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Laura Abril Parreño

INTRODUCCIÓN

La evaluación microscópica es una piedra angular del análisis del semen en la andrología humana, proporcionando información útil de la muestra de semen. Sin embargo, las pruebas convencionales se basan en la evaluación subjetiva de las características de los espermatozoides y tienen un limitado valor pronóstico de los resultados de fertilidad. Además, algunos casos de infertilidad masculina pueden ser diagnosticados erróneamente como idiopáticos, ya que ciertos tipos de anomalías espermáticas suceden a nivel molecular, a veces con ausencia de manifestaciones morfológicas. Para abordar este problema, se recurre a la identificación de biomarcadores de la calidad espermática y su posible relación con la baja calidad del semen y la reducción de la fertilidad.

Concretamente en este estudio nos centramos en el análisis de la implicación del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) en espermatozoides de humano, ya que como es sabido los espermatozoides de los mamíferos, con un defecto visible u oculto, adquieren ubiquitina en su superficie durante la maduración en el epidídimo (Sutovsky *et al.*, 2001a, Sutovsky *et al.*, 2001b) para posteriormente ser eliminados. Sin embargo, algunos de estos espermatozoides consiguen llegar al eyaculado al fallar los mecanismos para su eliminación.

Para el establecimiento de la ubiquitina como un biomarcador de infertilidad humana, Sutovsky *et al.*, (2004) realizaron un estudio, en el cual examinaron la relación entre el contenido de ubiquitina en espermatozoides y los parámetros clásicos de un espermograma, en varones clínicamente infértiles por diferentes etiologías. Sus resultados mostraron que los pacientes infértiles

(n=28) tenían valores altamente significativos de espermatozoides ubiquitinados, por lo que concluyen que el incremento de ubiquitinación está inversamente relacionado con la concentración espermática, la motilidad y el porcentaje de anomalías morfológicas. Estos resultados sustentan el uso de la ubiquitina como un biomarcador de calidad del semen humano y sugieren su uso en otras especies (Sutovsky *et al.*, 2004).

Por tanto, cabe esperar una relación entre parámetros de calidad espermática y estado del ADN con la presencia de ubiquitina en la superficie espermática mediante citometría de flujo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de semen fueron obtenidas de 24 pacientes de la clínica Genetika (Pilsen, República Checa). En primer lugar, según la V Edición del manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS), calculamos la concentración espermática y la motilidad de cada una de las muestras en la cámara Makler.

Citometría de flujo

Tras medir la concentración y motilidad de cada muestra mediante microscopía, se evaluaron la actividad mitocondrial (Mitotracker/YoPro-1) y la fragmentación del ADN (Ensayo de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA)) mediante citometría de flujo. El resto de muestra se dividió en dos (una parte para el control negativo). Ambas partes fueron resuspendidas con medio Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) y centrifugadas, para después ser fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente fueron lavadas con PBS-NAN3 (suplementado con suero de cabra al 1%) y bloqueadas con este mismo suero al 5%.

A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo Anti-Ubiquitina conjugado con FITC (DyLightR 488, Abcam) a una concentración de 1/100 durante 60 minutos. Mientras que los controles negativos no se incubaron con dicho anticuerpo. Finalmente, las muestras fueron lavadas, resuspendidas en PBS y analizadas mediante citometría de flujo (BD FACS Verse, Becton Dickinson).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v. 22 (SPSS Inc, Chicago, III). Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$. Se estudiaron las correlaciones entre los diferentes parámetros espermáticos evaluados. Además, para el estudio de las diferencias entre parámetros espermáticos en diferentes grupos de muestras (según su bajo o medio-alto %DFI y su bajo o alto %HDS) se utilizó un modelo mixto lineal donde el individuo fue considerado como efecto aleatorio.

RESULTADOS

La población de estudio consistió en 24 pacientes, de los cuales se obtuvo información de los parámetros espermáticos, actividad mitocondrial, estado del ADN y porcentaje de espermatozoides ubiquitinados. El porcentaje de espermatozoides ubiquitinados no fue significativamente correlacionado con los parámetros de calidad espermática como la concentración espermática ($r = -0,329$; $P = 0,117$) y motilidad progresiva ($r = -0,215$; $P = 0,314$). Tampoco se encontró una correlación significativa con la actividad mitocondrial, en concreto para nosotros los espermatozoides de interés son aquellos viables con actividad mitocondrial (Mitotracker+/YoPro-1-) ($r = -0,151$; $P = 0,491$).

Además, no fue significativa la correlación observada entre el índice

de fragmentación de ADN (%DFI, Dna Fragmentation Index) que se corresponde con el porcentaje de espermatozoides con alto daño en el ADN y la media de intensidad de fluorescencia de la ubiquitina ($r=0,060$; $P= 0,468$). Tampoco se observó una correlación significativa entre la media de intensidad de fluorescencia de la ubiquitina y el porcentaje de células espermáticas inmaduras (%HDS, High Dna Stainability), ($r= 0,096$; $P=0,698$).

Pero hemos de destacar que cuando las muestras se agruparon teniendo en cuenta su bajo o medio-alto %DFI, aunque no se encontraron diferencias respecto al porcentaje de espermatozoides ubiquitinados, sí se encontraron diferencias significativas entre grupos de muestras para el porcentaje de espermatozoides no progresivos ($P= 0,008$). Del mismo modo, cuando las muestras se agruparon en función de su bajo o alto %HDS, se observaron diferencias significativas entre grupos para los espermatozoides con motilidad progresiva ($P= 0,041$); aquellos con motilidad no progresiva ($P= 0,014$); y con los espermatozoides

viabiles con actividad mitocondrial ($P= 0,039$). Tampoco encontramos diferencias significativas para el porcentaje de espermatozoides ubiquitinados entre grupos de muestras con diferente %HDS.

Sin embargo, tendríamos que analizar también la correlación entre el porcentaje de ubiquitinación y la tasa de fecundación de cada una de las muestras, las cuales nos serán cedidas por la propia clínica en los próximos meses.

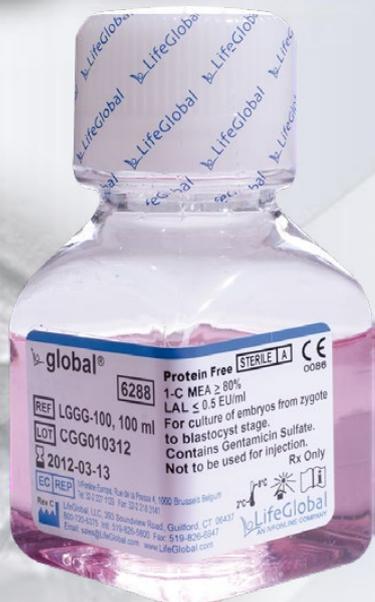
DISCUSIÓN

Por tanto, teniendo en cuenta el pequeño tamaño muestral ($n= 24$) y nuestras condiciones de análisis (ubiquitina en la superficie espermática evaluada mediante citometría de flujo), la ubiquitina no es buen indicador de calidad espermática.

Por ello, para concluir un resultado robusto necesitaríamos mayor tamaño muestral y obtener los datos de fecundación de la clínica. Ya que según muchos estudios, la citometría de flujo si

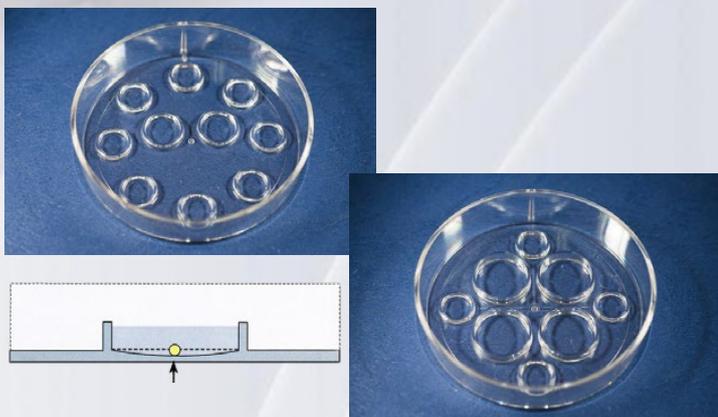
es una buena herramienta para valorar la calidad seminal ya que la medida de información es objetiva, rápida ya que se miden miles de células por muestra, automática y robusta estadísticamente para la obtención de niveles relativos de biomarcadores en las muestras de semen humano. Aunque debemos de tener muy presente que aunque esta técnica ofrezca la ventaja de poder medir biomarcadores la muestra no se puede utilizar clínicamente.

Por ello, es importante plantearse el siguiente paso en el análisis seminal con técnicas no invasivas como los microfluidos, espectroscopia RAMAN o selección celular inmunomagnética (MACS) de los espermatozoides como hacemos hincapié en una revisión que realizamos durante la presente estancia y que actualmente está aceptada y pendiente de su publicación (Štiavnická M, **Abriil-Parreño L**, Nevorál J, Kraličkova M, Garcia Álvarez O. Non-invasive approaches for epigenetics-based sperm selection. *Med Sci Monit* 2017, *in press*. IF = 1.403).



Global® Medio Único

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



Placas de cultivo GPS

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



Aceite LifeGuard® Oil

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



Medidor de pH epoc®

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

AGENDA CURSOS ASEBIR 2017

FIRST JOINT MEETING ASEBIR & SIERR FROM DONOR TO RECIPIENT. FROM SPAIN TO ITALY

Fecha: 15 Noviembre 2017
Sede: IX Congreso ASEBIR en Madrid
Secretaría técnica: Grupo Process (Betaprocess S.L.)
Email: info2@ongresoasebir.es
Organizado por ASEBIR en el marco del IX Congreso ASEBIR

PAPEL DEL TÉCNICO EN LOS LABORATORIOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Fecha: 15 Noviembre 2017
Sede: IX Congreso ASEBIR en Madrid
Secretaría técnica: Grupo Process (Betaprocess S.L.)
Email: info2@ongresoasebir.es
Organizado por ASEBIR en el marco del IX Congreso ASEBIR

CULTURE, CLASSIFICATION AND VITRIFICATION / DEVITRIFICATION OF HUMAN BLASTOCYSTS

Fecha: 15 Noviembre 2017
Sede: IX Congreso ASEBIR en Madrid
Secretaría técnica: Grupo Process (Betaprocess S.L.)
Email: info2@ongresoasebir.es
Organizado por los Grupos de interés de EMBRIOLOGÍA Y
CRIOBIOLOGÍA de ASEBIR en el marco del IX Congreso ASEBIR.

AGENDA DE CONGRESOS 2017

ESHRE 2017

Dates: 2-5 July 2017
Place: Geneva, Switzerland
For more information: <https://www.eshre2017.eu>

ASRM 2017

73rd ASRM Scientific Congress & Expo
Dates: October 28-November 01, 2017
Place: San Antonio, TX, USA
For More Information: ASRM
Tel: 205-978-5000,
Fax: 205-978-5018
Email: asrm@asrm.org
Web: <https://www.asrm.org/awards/detail.aspx?id=11616>

IX CONGRESO ASEBIR MADRID 2017

Fechas: 15-17 de noviembre de 2017
Sede: Centro de Convenciones Hotel Meliá Castilla, Madrid
Secretaría técnica: Grupo Process S.L.
E-mail: info@congresoasebir.es
Teléfono: 91 377 14 23
Web: <http://congresoasebir.es/>

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

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

- Características morfológicas
- Clasificación y decisión clínica*

*Test de citotoxicidad con medios tamponados
con HEPES para ensayo SMA*

Características específicas: Duración: 1 año.

Nº Especímenes: vídeo y material esterilizado.

Envío de muestra: Uno

Envío documentación: Uno

Envío de datos: Vía página web

Informes: Valoración por consenso de laboratorios

Valoración por consenso de grupo de expertos

Proceso de datos: Informatizado

PLAZO DE INSCRIPCIÓN

DESDE 30/06/2017 HASTA 30/09/2017

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

*Según criterios ASEBIR de valoración 2015

Con la colaboración de:

Ceifer

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

www.asebir.com

ASEBIR

UNA APUESTA POR LA CALIDAD