



REVISTA

# ASEBIR

## 4º CONGRESO ASEBIR

### IV CONGRESO ASEBIR

21 AL 23 DE NOVIEMBRE DE 2007  
BILBAO. PALACIO EUSKALDUNA



ASEBIR  
IV CONGRESO  
BILBAO 2007

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO  
DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**Libro de  
ponencias y  
comunicaciones**

*Bilbao,  
del 21 al 23 de  
Noviembre de 2007*



# Instrumentación para FECUNDACIÓN IN VITRO

## Incubadores de CO<sub>2</sub>:

## Heracell 150/240

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



## Cabinas de flujo laminar para FIV:

## Sterile SS / AI

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



## Centrífugas:

## Multifuge 1

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



## Autoclaves:

## Systemc

- ✓ Modelos verticales y horizontales
- ✓ Varias capacidades
- ✓ Generador de vapor integrado y completamente independiente de la cámara de esterilización



## Otros equipos relacionados



Controltecnica Instrumentación Científica S.L.

C/ Artesanos, 7 (Prado del Espino)  
Tel. 902 431 408

28660 Boadilla - Madrid  
Fax. 91 729 44 54

BARCELONA: 93 486 46 60

ANDALUCÍA: 679 21 02 33

VALENCIA: 679 20 85 37

618 73 78 48

LA RIOJA: 648 09 27 09

MURCIA: 686 93 68 31

www.controltecnica.com

SORVALL®  
Heracell

CONTROLTECNICA  
instruments

# ASEBIR

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ÍNDICE	PÁG
<b>EDITORIAL Carta de Bienvenida.</b> .....	5
Antonio.L. González-Utor y Carmen. Ochoa	
<b>Comité Organizador</b> .....	6
<b>Programa Científico</b> .....	7
<b>Grupos de Interés ASEBIR</b>	
<b>Calidad embrionaria:</b>	
<b>Clasificación ASEBIR de la Calidad embrionaria.Estado actual</b> .....	14
Jorge Tén	
<b>Normalización de datos de laboratorio de reproducción humana</b> .....	17
María José de los Santos	
<b>Proyectos de futuro del grupo de calidad embrionaria</b> .....	24
Jorge Cuadros	
<b>Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP)</b>	
<b>Realidad diagnóstica del "DGP"</b> .....	27
Esther Fernández	
<b>Gestión de calidad en los laboratorios del "DGP"</b> .....	36
Xavier Vendrell	
<b>Ensayo piloto de un programa de gestión de calidad externo para FISH en espermatozoides</b> .....	43
Juan Pablo Ramírez	
<b>La nueva ley de reproducción asistida y su implicación en el "DGP"</b> .....	47
Esther Velilla	
<b>I Sesión: Investigación Básica en Embriología</b>	
<b>Sistema opioide y fertilidad masculina</b> .....	51
J. Irazusta, E. Agirregoitia, N. Subiran	
<b>Calidad ovocitaria: Importancia del diagnóstico para el pronóstico y la decisión terapéutica</b> .....	60
M. Sousa, R. Sá, N. Cremades, J. Silva, C. Oliveira, A. Barros	
<i>Selection of the best spermatozoa at high magnification: Can we consider Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) as the new generation of ICSI?</i>	
.....	67
P. Vanderzwalm	
<b>Pluripotencialidad de las células madre embrionarias</b> .....	71
Á. Raya	
<b>Sesión II: Laboratorio de embriología</b>	
<b>Marcadores no morfológicos de calidad embrionaria</b> .....	72
M. Van den Bergh	
<b>Indicadores de calidad en el laboratorio de embriología</b> .....	76
E. Veiga	
<b>III Sesión: "Relación clínico-embriológica"</b>	
<b>Tipos de tratamientos de estimulación ovárica y motivos de selección</b> .....	83
F. Fábregues	
<b>Infertilidad de causa genética</b> .....	93
R. Oliva	
<b>Métodos contraceptivos y fertilidad posterior</b> .....	106
E. Pérez	
<b>Resultados SEF 2004</b> .....	113
J.A. Castilla	
<b>IV Sesión: "Aspectos Jurídicos de los tratamientos de reproducción asistida humana"</b>	
<b>Evolución de la protección del embrión en la normativa española: de la ley de reproducción de 1988 a la clonación terapéutica</b> .....	117
F. Abellán	
<b>Directivas del Parlamento Europeo y del Consejo 2004/23/CE y 2006/17/CE, relativas a las normas y requisitos técnicos para la donación y distribución de células y tejidos humanos y su relación con las recomendaciones de las sociedades científicas Europeas</b> .....	134
V. Jasa, M.A. Baile y A. Calvo	
<b>V Sesión: Debate.Diferentes métodos de cultivo embrionario</b> .....	143
O.Cairo, N.Prados	
<b>Aula Virtual.Métodos de Fijaciónde blastómeras tras biopsia embrionaria</b> .....	162
Carmen Rubio	
<b>Exposición Premio Asebir-EMB 2005</b>	
<b>Estudio ultraestructural y citoquímico del retículo endoplasmático de ovocitos humanos</b> .....	164
I.Mondejar	
<b>Agradecimientos</b> .....	175

CD: COMUNICACIONES ORALES Y PÓSTER

Diciembre 2007 Vol. 12 • Nº2

## EDITA.

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

## JUNTA DIRECTIVA.

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

## COORDINACIÓN

### DE LA REVISTA.

*Nieves Cremades*

*Mark Grossmann*

*M<sup>a</sup> Victoria Hurtado de Mendoza*

## PUBLICIDAD Y COLABORACIONES.

### ASEBIR

#### Secretaría ASEBIR:

c/ Cronos , nº 20, Bloque 4 , Local 6

MADRID 2029

Tel. 91 367 89 94 - Fax 91 377 49 65

asebir@asebir.com

## DISEÑO, MAQUETACIÓN e IMPRESIÓN.

### RECCO Imagen y Desarrollo, S.L.L.

c/ Albarracín, 56 - 28037 Madrid

Tel. 91 754 00 26 - Fax 91 754 16 05

E-mail: recco@recco-sll.com

Depósito Legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

Soporte Válido: 78-R-CM



El comienzo de la vida, en manos seguras



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

MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.

**MediCult España S.L.**

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

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

[www.medicult.com](http://www.medicult.com)



**MediCult**

Innovation with Care



## CARTA DE BIENVENIDA

---

Queridas compañeras y compañeros:

En primer lugar quisiera felicitaros por vuestra participación, por el rigor y calidad de los trabajos presentados y la voluntad de reunión que habéis mostrado, sin cuyos valores este congreso no hubiera sido posible.

Este año hemos aumentado los días de reunión, motivado por la capacidad de trabajo de los grupos de interés que ha hecho necesaria la utilización de un espacio dentro del programa científico para exponer y comentar sus conclusiones. También, se ha visto incrementado el número de trabajos recibidos, alcanzando un total de 158.

Hemos conseguido que el comité evaluador del consejo vasco de las profesiones sanitarias conceda 2,2 créditos a nuestro evento, lo cual esperamos sea de utilidad para vuestras carreras profesionales. Además, nuestro congreso ha sido declarado de interés sanitario por el Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco.

También contamos con la traducción simultánea en aquellas ponencias expuestas en habla inglesa, con la intención de que el aprovechamiento de los ponentes extranjeros, así como la posibilidad de intercomunicación con ellos, sea máximo y homogéneo entre todos los asistentes.

Fuera del programa científico, pero dentro del espacio temporal de nuestro congreso, se han organizado dos interesantes Simposium Satélites, prueba fehaciente de la buena y necesaria colaboración entre la industria y la ciencia. Momento que aprovecho para agradecer encarecidamente, a los patrocinadores su colaboración que también espero se sientan bien atendidos, con el deseo que este congreso cumpla sus expectativas.

Los comités organizador y científico y la secretaría técnica hemos trabajado con ahínco, intentando proporcionaros todas las comodidades y el nivel científico esperado, consolidado por aquellos que han sido nuestros antecesores en la organización de las convocatorias pasadas. Solo si conseguimos vuestra satisfacción, conseguiremos la nuestra.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han colaborado activamente en que este IV Congreso de ASEBIR, sea una realidad. A los que están y a los que no están, pero que fueron una parte importante en nuestra sociedad, reconocemos su contribución al alto nivel adquirido por este evento, que repercute directamente en la propia Asociación. Esperamos poder contribuir a que siga aumentando.

Estoy encantada de recibirlos y enseñaros Bilbao, mi ciudad, que espero consideréis la vuestra.

Os espero del 21 al 23 de Noviembre en el Palacio Euskalduna de Bilbao

¡Hasta pronto!

Dra. Carmen Ochoa  
Presidenta del Comité Organizador

Dr. Antonio González-Utor  
Presidente de ASEBIR

## IV Congreso Nacional ASEBIR BILBAO 2007

### COMITÉ DE HONOR

Excma. Sra. Dña. Elena Salgado Méndez \*  
Ministra de Sanidad y Consumo

Excmo. Sr. D. Juan José Ibarretxe  
Lehendakari del Gobierno Vasco

Excmo. Sr. D. Gabriel Inclán  
Consejero de Sanidad del Gobierno Vasco

Excmo. Sr. D. Iñaki Azkuna  
Alcalde de Bilbao

\*Con fecha 26 de marzo, la Excma. Sra. Dña. Elena Salgado aceptó formar parte del Comité de Honor del IV Congreso Nacional ASEBIR. Estamos a la espera de la aceptación del Excmo. Sr. D. Bernat Soria, actual titular del Ministerio de Sanidad y Consumo.

### COMITÉ ORGANIZADOR

#### *Presidenta*

Dra. Carmen Ochoa

#### *Vocales*

Dr. Jon Aizpurua  
Dra. Rosa Argatxa  
Dr. Txema Aritzeta  
Dr. Gorka Barrenetxea  
Dra. Beatriz Corcóstegui  
Dra. Antonia Expósito  
Dr. Roberto Lertxundi  
Dra. Carmen Mar  
Dr. Txanton Martínez-Astorquiza  
Dra. Belén Murillo

### COMITÉ CIENTÍFICO

Dra. Victoria Aparicio  
Dra. Begoña Aran  
Dra. Itziar Belil  
Dra. Nieves Cremades  
Dra. María José de los Santos  
Dr. José Luís de Pablo  
Dr. José María Fernández  
Dr. Mark Grossmann i Camps  
Dra. María Victoria Hurtado de Mendoza  
Dra. Rosario Mendoza  
Dr. Ernesto Veiga

### SECRETARIA TÉCNICA



Grupo Process

Telf.: +34 91 377 14 23

E-mail: [IVcongreso@asebir.com](mailto:IVcongreso@asebir.com)

CONGRESO DECLARADO DE INTERÉS SANITARIO POR EL DEPARTAMENTO DE SANIDAD DEL GOBIERNO VASCO / EUSKO JAURLARITZA.

EL COMITÉ DE EVALUACIÓN DEL CONSEJO VASCO DE FORMACIÓN CONTINUADA DE LAS PROFESIONES SANITARIAS HA ACORDADO CONCEDER 2,2 CRÉDITOS A LOS CONGRESISTAS ASISTENTES AL IV CONGRESO NACIONAL DE ASEBIR (Nº EXPEDIENTE 332/07).

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

### 21 DE NOVIEMBRE (MIÉRCOLES)

#### TARDE

- 15:00 - 20:00h. **Apertura de secretaría. Entrega de documentación y colocación de pósters**
- 16:00h. **Inauguración del IV Congreso Nacional de ASEBIR**  
 -*Auresku* de Honor  
 -Inauguración por parte de autoridades, del Dr. Antonio L. González Utor, Presidente de ASEBIR y de la Dra. Carmen Ochoa, Presidenta del Comité Organizador
- 17:00 - 20:30h. **GRUPOS DE INTERÉS ASEBIR**
  - 17:00h. **CALIDAD EMBRIONARIA**  
Moderador: Dr. Fernando Prados (Madrid)
  - 17:00-17:15h. Clasificación ASEBIR de la calidad embrionaria. Estado actual.  
Dr. J. Tén Morro (I. Bernabeu, Alicante)
  - 17:15-17:30h. Normalización de datos de laboratorio de reproducción humana  
Dra. M. J. de los Santos (IVI, Valencia)
  - 17:30-17:45h. Proyectos de futuro del grupo de interés de calidad embrionaria  
Dr. J. Cuadros (Clínica FIV, Madrid)
  - 17:45-18:30h. Mesa redonda
  - 18:30h. **DIAGNOSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)**  
Moderador: Dr. Carles Giménez (Reprogenetics, Barcelona)
  - 18:30-18:45h. Realidad diagnóstica del DGP.  
Dra. E. Fernández (H. Quirón, Madrid)
  - 18:45-19:00h. Gestión de calidad en los laboratorios de DGP.  
Dr. X. Vendrell (Sistemas Genómicos, Valencia)
  - 19:00-19:15h. Ensayo piloto de un programa de control de calidad externo para FISH en espermatozoides  
Dr. J. P. Ramírez López (CEIFER, Granada)
  - 19:15-19:30h. La nueva ley de reproducción asistida y sus implicaciones para el DGP  
Dra. E. Velilla (I. Marqués, Barcelona)
  - 19:30-20:00h. Mesa redonda
- 20:30h. **Cocktail Inaugural en el Hall de Exposiciones del Palacio Euskalduna**

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

### 22 DE NOVIEMBRE (JUEVES)

#### MAÑANA

- 08:00 - 14:00h. **Apertura de secretaría. Entrega de documentación y colocación de pósters**
- 09:00h. **Apertura mesa electoral ASEBIR**
- 08:30 - 09:00h. **COMUNICACIONES ORALES: Diagnóstico**  
Moderadores: Dra. Beatriz Corcóstegui (Bilbao) y Dra. Carmen Mar (Bilbao)
- 08:30 a 08:40h. Comunicación O-001. Cuándo realizar un FISH en “zoides”  
C. Roméu, M. Lorés, A. Urries. (C. Quirón, Zaragoza)
- 08:40 a 08:50h. Comunicación O-002. Consecuencias reproductivas en varones portadores de diferentes alteraciones cromosómicas  
F. Bronet, C. Méndez, MC. Martínez, P. Alberó, J. Landeras. (IVI, Madrid)
- 08:50 a 09:00h. Comunicación O-003. Mejora en la selección de donantes de semen  
C. Anarte, J. L. de Pablo, S. Ortega, I. Peñalba, M. Martín, A. Tejera, A. Pacheco (IVI, Bilbao)
- 09:00 - 11:30h. **I SESIÓN: Investigación básica en embriología**  
Moderadores: Dra. Ana Veiga (Barcelona) y Dra. Maria José de los Santos (Valencia)
- 09:00 a 09:30h. Sistema opioide y fertilidad masculina  
Dr. J. Irazusta, E. Agirregoitia, N. Subiran (Dpto. Fisiología. F. Medicina. UPV/EHU, Bizkaia)
- 09:30 a 10:00h. Calidad ovocitaria: Importancia del diagnóstico para el pronóstico y la decisión terapéutica  
Dr. M. Sousa, R. Sá, N. Cremades, J. Silva, C. Oliveira, A. Barros (ICBAS–UP, Oporto, Portugal)
- 10:00 a 10:30h. *Selection of the best spermatozoa at high magnification: Can we consider Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) as the new generation of ICSI?*  
Dr. P. Vanderzwalmen (I. M. de Reproduction et de l'Endocrinologie, Bergenz, Austria)
- 10:30 a 11:00h. Pluripotencialidad de las células madre embrionarias  
Dr. Á. Raya (Centro de Medicina Regenerativa, Barcelona)
- 11:00 a 11:30h. Discusión
- 11:30 - 12:00h. **Pausa. Café**
- 12:00 - 14:00h. **COMUNICACIONES ORALES: Investigación básica**  
Moderadores: Dr. Jorge Martín Cuadros (Madrid) y Dra. Nieves Cremades (Alicante)
- 12:00 a 12:10h. Comunicación O-004. Derivaciones de células madre embrionarias humanas: Experiencia en el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. B. Aran, I. Rodríguez, A. Raya, Y. Muñoz, M. Luna, P. Barri, A. Veiga, J.C. Izpisúa. (Centro de Medicina Regenerativa, Barcelona)

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

- 12:10 a 12:20h. Comunicación O-005. Comparación de dos métodos de derivación de células madre embrionarias a partir de blastómeros aislados  
S. González, E. Ibáñez, N. Costa, J. Santaló. (F. Biociencias. UAB, Barcelona)
- 12:20 a 12:30h. Comunicación O-006. El factor de transcripción Fork Head (FOXJ2) se expresa en células de la granulosa humana  
P. Sánchez-Aparicio, C. Romero, R. Ramos, B. Hurtado de Mendoza, J. Cuadros, E. R. Hernández. (FIV, Madrid)
- 12:30 a 12:40h. Comunicación O-007. Efecto de la criopreservación en ovocitos humanos: análisis de los gránulos corticales  
I. Mondéjar, A. Cobo, J. Marcos, M.T. Zomeño, J. Remohí, J. Zulategui, S. Pérez, J. Ballesta, M. Avilés. (F. Medicina. UM, Murcia)
- 12:40 a 12:50h. Comunicación O-008. Expresión y localización de las enzimas-degradadoras de encefalinas en espermatozoides humanos.  
N. Subirán, E. Agirregoitia, A. Valdivia, C. Ochoa, J. Gil, J. Irazusta. (UPV/EHU, Bizkaia)
- 12:50 a 13:00h. Comunicación O-009. Incidencia de anomalías epigenéticas de los loci H19 y SNRPN en espermatozoides de individuos que consultan por problemas de fertilidad  
M. Pladevall, C. Camprubí, M. Grossmann, MC. Pons, J. Blanco. (UAB, Barcelona)
- 13:00 a 13:10h. Comunicación O-010. Cambios en la distribución de lectinas en muestras teratozoospérmicas tras la capacitación  
MJ. Gómez Torres, B. Ramos, JL. Girela, M. Avilés, PJ. Fernández-Colom, J. Ballesta, A. Romeu, J. De Juan. (F. Ciencias. UA, Alicante)
- 13:10 a 13:20h. Comunicación O-011. Evaluación del glicocáliz de espermatozoides humanos, con lectinas marcadas, en muestras astenozoospérmicas tras la capacitación  
MJ. Gómez-Torres, A. Navarro, JL. Girela, A. Montoya, B. Ramos, M. Avilés, PJ. Fernández-Colom, J. Ballesta, A. Romeu, J. De Juan. (F. Ciencias. UA, Alicante)
- 13:20 a 13:30h. Comunicación O-012. Efectos del calcio sobre la apoptosis inducida por H2O2 y progesterona en espermatozoides humanos  
G. Lozano, I. Bejarano, A. Ortiz, M.I. Jiménez G, J. F. García, S.D. Paredes, A.B. Rodríguez, J.A. Pariente (CERHA, Badajoz)
- 13:30 a 13:40h. Comunicación O-013. FISH en espermatozoides: indicaciones, número de cromosomas y consejo genético  
Z. Sarrate, F. Vidal, J. Blanco, (F. Biociencias. UAB, Barcelona)
- 13:40 a 13:50h. Comunicación O-014. Expresión del gen de la proteína inhibidora de CDKs p27kip1 en ovocitos y embriones humanos procedentes de FIV  
S. Cívico, N. Agell, LI. Hernández, O. Bachs, E. Campo, J. Balasch. (H. Clínic, Barcelona)
- 13:50 a 14:00h. Comunicación O-015. Etiología genética del Fallo Ovárico Prematuro (FOP) y su relación con el Síndrome X Frágil  
M.I. Tejada, E. Beristain, C. Martínez, N. Puente, N. Viguera, M. Artigas, M.A. Ramos, B. Prieto, A. Etxanojaúregui, S. González, J. Peña, C. Puyo, D. Andía, R. Matorral. (H. Cruces, Bizkaia)
- 14:00 - 15:00h. **Almuerzo**
- 15:00 - 16:00h. **Simpósium satélite. Maduración de ovocitos *In Vitro*. MediCult España**

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

### 22 DE NOVIEMBRE (JUEVES)

#### TARDE

- 15:00 - 19:30h. Horario de atención de secretaría
- 16:00 - 17:20h. **II SESIÓN: Laboratorio de embriología**  
Moderadores: Dra. Rosario Mendoza (Bilbao) y Dra. M<sup>a</sup> Victoria Hurtado de Mendoza (Sevilla)
- 16:00 a 16:30h. Marcadores no morfológicos de calidad embrionaria  
Dr. M. Van den Bergh (Kantonsspital Baden A.G., Suiza)
- 16:30 a 17:00h. Indicadores de calidad en el laboratorio de embriología  
Dr. E. Veiga (IRAGA, Santiago de Compostela)
- 17:00 a 17:20h. Discusión.
- 17:20 -17:40h. **Pausa (Visita *stands* y pósters)**
- 17:40 -20:00h. **III SESIÓN: Relación Clínico-Embriológica**  
Moderadores: Dr. Roberto Lertxundi (Bilbao) y Dr. Gorka Barrenetxea (Bilbao)
- 17:40 a 18:10h. Tipos de tratamientos de estimulación ovárica y motivos de selección  
Dr. I. Fábregues (URA. H. Clínico, Barcelona)
- 18:10 a18:40h. Infertilidad de causa genética  
Dr. R. Oliva (URA. H. Clínico, Barcelona)
- 18:40 a 19:10h. Métodos contraceptivos y fertilidad posterior  
Dr. E. Pérez (H. G. de Requena, Valencia)
- 19:10 a 19:40h. Resultados SEF 2004  
Dr. J. A.Castilla (H. U. Virgen de las Nieves, Granada)
- 19:40 a 20:00h. Discusión
- 18:30h. **Cierre mesa electoral ASEBIR**
- 21:00 - 22:30h. **Visita privada al Museo Guggenheim**
- 22:30h. **Cena Congresual Gran Hotel Dómine Bilbao**

### 23 DE NOVIEMBRE (VIERNES)

#### MAÑANA

- 08:00 - 14:00h. Horario de atención de secretaría
- 08:30 - 09:30h. **COMUNICACIONES ORALES: Ovocitos y Embriones**  
Moderadores: Dra. Belén Murillo (Bilbao) y Dr. Jorge Ten (Alicante)
- 08:30 a 08:40h. Comunicación O-016. Resultados del programa de MIV del Institut Universitari Dexeus  
C. González-Llagostera, G. Arroyo, B. Carrasco, F. Martínez, R. Tur, A. Veiga. (I. U. Dexeus, Barcelona)

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

- 08:40 a 08:50h. Comunicación O-017. Análisis con microscopia de luz polarizada de la configuración del huso meiótico y de la zona pelúcida en ovocitos humanos madurados *in vitro*  
G. Arroyo, F. Martínez, R. Tur, B. Carrasco, I. Belil, M. Boada, B. Coroleu, A. Veiga. (I. U. Dexeus, Barcelona)
- 08:50 a 09:00h. Comunicación O-018. Elevadas tasas de supervivencia y gestación en la vitrificación de ovocitos mediante el método del cryotop  
J.F. Zulategui, S. Pérez, C. Albert, M. Meseguer, J.L. Romero, M.J. Escribá, M.J. de los Santos, A.C. Cobo. (IVI, Valencia)
- 09:00 a 09:10h. Comunicación O-019. Eficacia de la vitrificación de embriones: resultados en CREA tras dos años de experiencia  
E. Ferrer, M. Vila, M. Ferrer, C. Calatayud, M. Ruiz. (CREA, Valencia)
- 09:10 a 09:20h. Comunicación O-020. Reversión de la multinucleación blastomérica en embriones con ritmo óptimo de división en los primeros estadios del desarrollo embrionario  
M.C. Pons, I. Solvas, M. Grossmann, I. Vanrell, E. Coloma, X. Julve, J. Nadal. (C. M. Teknon, Barcelona)
- 09:20 a 09:30h. Comunicación O-021. Dotación cromosómica de cigotos mono-pronucleares  
J. Muñoz, F. Bronet, I. Cabañes, M. Aragonés, J.A. García-Velasco. (IVI, Madrid)
- 09:30 - 11:00h. **IV SESIÓN. Aspectos jurídicos de los tratamientos de reproducción asistida humana**  
Moderadores: Dr. Manuel Ardoy (Madrid) y Juan Manuel Moreno (Alicante)
- 09:30 a 10:00h. Evolución de la protección del embrión en la normativa española: de la ley de reproducción de 1988 a la clonación terapéutica  
Dr. F. Abellán (Derecho Sanitario Asesores, Madrid)
- 10:00 a 10:30h. Directivas del Parlamento Europeo y del Consejo 2004/23/CE y 2006/17/CE, relativas a las normas y requisitos técnicos para la donación y distribución de células y tejidos humanos y su relación con las recomendaciones de las sociedades científicas Europeas  
Dr. V. Jasa, M.A. Baile y A. Calvo (Dpto. Sanidad Gobierno Vasco/Eusko Jaurlaritza, CAV/Euskadi)
- 10:30 a 11:00h. Discusión.
- 11:00 - 11:30h. **Pausa. Café**
- 11:30 - 13:00h. **ASAMBLEA ASEBIR y presentación de la nueva Junta Directiva**
- 13:00 - 14:00h. **COMUNICACIONES ORALES: Técnicas de Reproducción Asistida**  
Moderadores: Dra. Esperanza Navarro (Bilbao) y Dr. José M<sup>a</sup> Fidel Fernández (Valladolid)
- 13:00 a 13:10h. Comunicación O-022. ¿Existe algún efecto positivo con el Láser *Assisted Hatching* (LAH) en ciclos de embriones congelados?  
B. Amorocho, D. López, D. Gumbao, P. Albero, L. Fernández, M. Nicolas, J. Landeras. (IVI, Murcia)

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

- 13:10 a 13:20h. Comunicación O-023. Efecto de la aspiración de fragmentos en embriones que exceden el 10% de fragmentación sobre las tasas de gestación e implantación de ciclos de fecundación *in vitro*  
M. Florensa, M. Eibert, M. Riqueros, M. Martín, A. Ballesteros, G. Calderón. (IVI, Barcelona)
- 13:20 a 13:30h. Comunicación O-024. Valoración de la aplicación del sistema de clasificación ASEBIR en Centro Médico Teknon  
I. Vanrell, M C. Pons, M. Grossmann, I. Solvas, E. Coloma, X. Julve, J. Nadal. (C. M. Teknon, Barcelona)
- 13:30 a 13:40h. Comunicación O-025. *Hatching* asistido con y sin aspiración de fragmentos: indicaciones clínicas  
S. Camacho, M. R. Luna, L. Lopez-Yañez, V. Badajoz, M. C. Cañadas, M. de la Casa, A. Díaz, I. Galán, J. A. Gragera, R. Bonache, J. Rodríguez, M. Alcaraz, A. M. Arenaza. (Ginefiv. Madrid)
- 13:40 a 13:50h. Comunicación O-026. Utilidad del estudio de fragmentación del DNA espermático en la indicación de TESA-ICSI en parejas con fallo repetido de embarazo en técnicas de reproducción asistida: resultados preliminares  
E. Toro, E. Velilla, S. Fernández, A. Colomar, A. Rabanal, M. Lopez-Teijón, F. García, JG. Alvarez. (I. Marqués, Barcelona)
- 13:50 a 14:00h. Comunicación O-027. Evaluación de los ciclos de ICSI según la madurez de los ovocitos recuperados  
C. Álvarez, O. Fuster, R. Taronger, C. García, G. González de Merlo. (H. G. U. de Albacete, Albacete)
- 14:00 - 15:00h. **Almuerzo**
- 15:00 – 16:00h. **Simpósium satélite. *Human embryo culture and vitrification*. EMB-Vitrolife**

### 23 DE NOVIEMBRE (VIERNES)

#### TARDE

- 16:00 - 16:30h. **AULA VIRTUAL**  
Moderadores: Dr. Fernando Marina (Barcelona) y Dr. Mark Grossmann (Barcelona)  
**Métodos de fijación de blastómeras tras biopsia embrionaria**  
Dra. C. Rubio Lluesa (IVI, Valencia)
- 16:30 - 17:30h. **COMUNICACIONES ORALES: Diagnóstico Genético Preimplantacional**  
Moderadores: Dr. Txerma. Aristzeta (Bilbao) y Dra. Itziar Belil (Barcelona)
- 16:30 a 16:40h. Comunicación O-028. Estrategias diagnósticas del DGP de enfermedades monogénicas: ¿enfermedades o mutaciones?  
X. Vendrell, T. Alberola, R. Bautista, M. Pérez-Alonso. (Sistemas Genómicos, Valencia)
- 16:40 a 16:50h. Comunicación O-029. Identificación de factores de buen pronóstico asociados al DGP en parejas con aborto de repetición  
P. Buendía, A. Mercader, L. Rodrigo, E. Mateu, T. Pehlivan, T. Viloria, B. Gadea, A. Delgado, V. Peinado, M. Milán, F. Bronet, C. Rubio. (IVI, Valencia)

## IV CONGRESO NACIONAL ASEBIR PROGRAMA CIENTÍFICO

- 16:50 a 17:00h. Comunicación O-030. Elevada tasa de mosaicismo embrionario tras DGP  
A. Colomar, S. Fernández, M Oter, M. Bermúdez, J. Álvarez, M. López-Teijón, E. Velilla. (I. Marqués, Barcelona)
- 17:00 a 17:10h. Comunicación O-031. DGP en portadores de translocaciones cromosómicas: Resultados Globales  
M. Parriego, F. Vidal, D. Tuñón, M. Boada, V. Coroleu, A. Veiga. (I. U. Dexeus, Barcelona)
- 17:10 a 17:20h. Comunicación O-032. DGP en parejas con cariotipo 47, XXY y 47, XYY y/o FISH de espermatozoides anormal  
V. Peinado, L. Rodrigo, E. Mateu, T. Viloría, T. Pehlivan, M. Milán, A. Mercader, I. Pérez, P. Buendía, A. Delgado, M. Gil-Salom, C. Rubio. (IVI, Valencia)
- 17:20 a 17:30h. Comunicación O-033. Nuestra experiencia en la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) como herramienta en el DGP: nueva era  
B. Lledó, D. Rodríguez-Arnedo, J. Ten, R. Bernabeu (I. Bernabeu, Alicante)
- 17:30 - 17:45h. **Pausa (visita *stands* y pósters)**
- 17:45 - 18:45h. **V SESIÓN: DEBATE**  
Moderadores: Dr. José Luis de Pablo (Bilbao) y Dra. Begoña Aran (Barcelona)  
**Diferentes métodos de cultivo embrionario**  
Dra. Olga Cairó (CIRH, Barcelona), Dr. Nicolás Prados (IVI, Sevilla)
- 18:45 - 19:00h. **Exposición Premio ASEBIR-EMB 2005.**  
Moderadores: Dra. Carmen Ochoa (Bilbao) y Dr. Antonio L. González Utor (Sevilla)  
**Estudio ultraestructural y citoquímico del retículo endoplasmático de ovocitos humanos**  
Dra. I.Mondéjar (Dpto. Biología Celular. UM, Murcia)
- 19:00 - 19:30h. **Entrega Premios ASEBIR-EMB 2007**
- 19:30 - 20:00h. **Clausura del IV Congreso Nacional de ASEBIR**
- 21:00h. **Cena de Clausura en los salones de la Sociedad Bilbaína**

# VITRIFICACIÓN

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

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



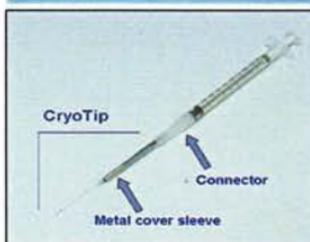
## VIT KIT-FREEZE:

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



## VIT KIT-THAW:

DESVITRIFICACIÓN: 15 min



## CRYOTIPS™:

sistema herméticamente cerrado de conservación de muestras: pajuela termosellada

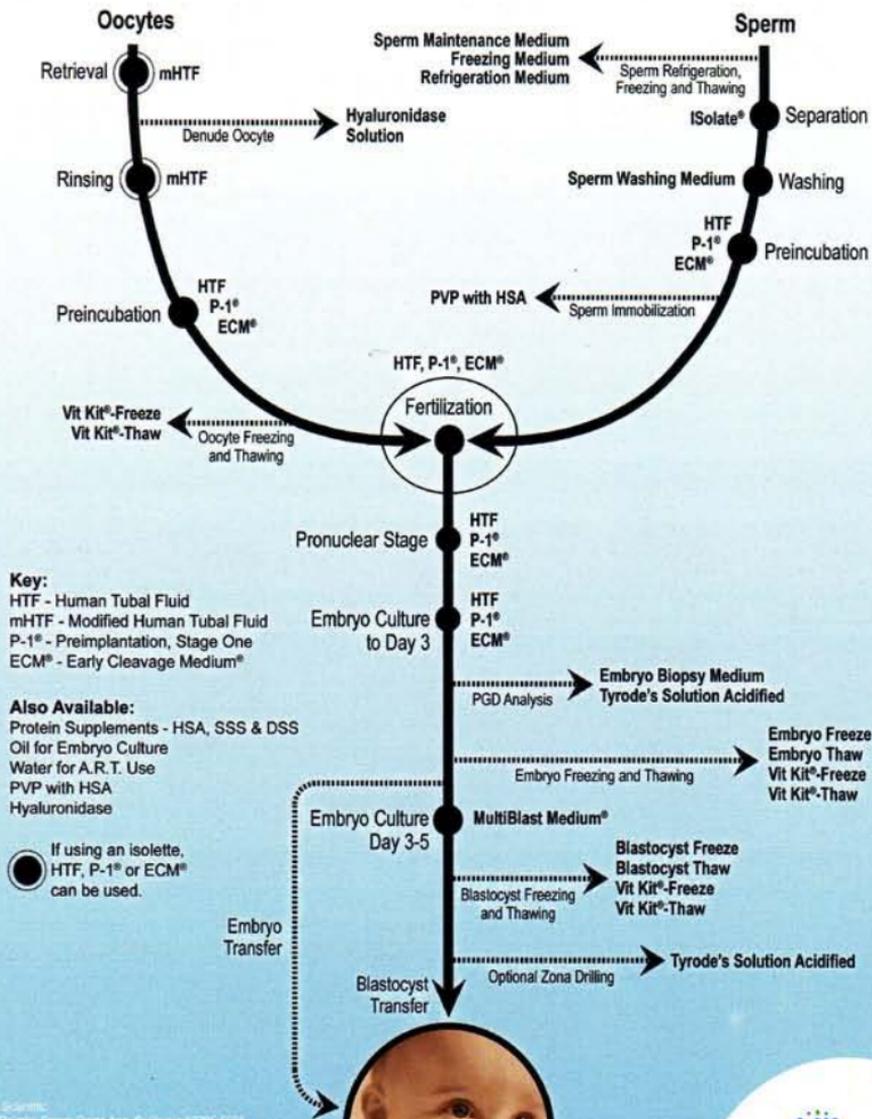
### Publicaciones recientes:

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

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

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

## Irvine Scientific's Sequential Media System



**Key:**

HTF - Human Tubal Fluid  
 mHTF - Modified Human Tubal Fluid  
 P-1® - Preimplantation, Stage One  
 ECM® - Early Cleavage Medium®

**Also Available:**

Protein Supplements - HSA, SSS & DSS  
 Oil for Embryo Culture  
 Water for A.R.T. Use  
 PVP with HSA  
 Hyaluronidase

● If using an isolette, HTF, P-1® or ECM® can be used.



Irvine Scientific  
 2511 Quince Street, Santa Ana, California 92705-5058  
 Telephone: 1-800-437-5105 - Fax: 1-949-261-8522

Irvine Scientific Ireland  
 Unit 21, Newpark Business & Enterprise Centre, Brook D  
 Newpark Business Park, County Wicklow - Ireland  
 Customer + Technical Service: 353 1 281 99 20  
 Fax: 353 1 281 99 25  
 www.IrvineSci.com

## CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA SEGÚN LOS CRITERIOS ASEBIR: RESULTADOS DE SU APLICACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA EN DIFERENTES CENTROS

Jorge Ten, Manuel Arday, Gloria Calderón, Jorge Cuadros, M<sup>a</sup> José de los Santos, Raquel Herrer, M<sup>a</sup> José Figueroa, Juan Manuel Moreno, Águeda Ortiz, Fernando Prados, Luz Rodríguez, Josep Santaló y M<sup>a</sup> José Torelló (Grupo de Interés "Calidad Embrionaria" de ASEBIR).  
Correo electrónico: [jten@institutobernabeu.com](mailto:jten@institutobernabeu.com)

### Introducción

La interpretación de la calidad embrionaria por parte de los Embriólogos Clínicos ha generado una clara falta de consenso que lleva implícita una serie de problemas habituales y no por ello menos importantes, como son la imposibilidad de generar estudios multicéntricos con valoraciones comunes de calidad embrionaria, la interpretación fiable de informes clínicos de laboratorios ajenos, o la comparación de datos que aparecen en la literatura científica. No menos importante es el estudio y la profundización en la clasificación embrionaria para poder "afinar" en la selección de los preembriones y alcanzar el objetivo soñado por todos que es el de evitar el embarazo múltiple, consiguiendo elevadas tasas de embarazo con la transferencia de un único preembrión.

Con el afán de aportar mayor claridad a este tema tan importante y al mismo tiempo controvertido, ASEBIR creó en Julio de 2004 una Comisión específica para ello, encaminada a unificar y consensuar todos aquellos parámetros de importancia implicados en una correcta y eficaz clasificación embrionaria. Para la realización de este trabajo, la Comisión se ha apoyado en una exhaustiva revisión bibliográfica, en la realización de una encuesta multicéntrica basada en dicha revisión, así como en la propia experiencia de los miembros de la Comisión.

El resultado ha sido la elaboración de una clasificación embrionaria en categorías (A: preembrión de óptima calidad, con máxima capacidad de implantación; B: preembrión de buena calidad, con elevada capacidad de implantación; C: preembrión regular, con una probabilidad de implantación media y D: preembrión de mala calidad, con una probabilidad de implantación baja). Esta clasificación ha sido recientemente publicada por ASEBIR dentro de sus "Cuadernos de Embriología Clínica" con el título de "Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos" y la cual pretendemos evaluar en este trabajo para confirmar su eficacia y validez tras la aplicación en la práctica clínica rutinaria. Una primera aproximación de la utilidad de esta clasificación fue comunicada por Torelló y colaboradores en el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad celebrado el año pasado en Zaragoza (Torelló et al., 2006). En ese trabajo se comparaba una clasificación propia en *score* con la clasificación ASEBIR en transferencias seleccionadas de un solo embrión. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, el empleo de la clasificación ASEBIR apuntó claramente hacia una mejor catalogación embrionaria.

No obstante, debemos tener en cuenta el dinamismo de este tipo de clasificaciones, las cuales pueden sufrir cambios debido a la incorporación o variación de parámetros morfológicos. Por tanto, las actualizaciones y revisiones futuras de este sistema de clasificación por parte del Grupo de Interés "Calidad Embrionaria" de ASEBIR se hacen necesarias.

## Material y Métodos

Por cuestiones de falta de tiempo, los datos presentados en este resumen son incompletos, ya que incorporan los resultados procedentes de 4 centros pertenecientes al Grupo de Interés en Calidad Embrionaria de ASEBIR. No obstante, la información que se presentará en el Congreso pretende ser mucho más amplia y con un tratamiento estadístico exhaustivo.

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se presentan los resultados derivados del empleo de la clasificación ASEBIR sobre las tasas de implantación en transferencias de 100% versus 0% implantación en parejas de cualquier edad, número de ciclos previos realizados y causa y tiempo de esterilidad, las cuales se sometieron a tratamientos FIV-ICSI. Las receptoras de ovocitos quedaron excluidas de este trabajo. Los centros se enuncian con los números 1 al 4. Se llevaron a cabo tablas de contingencia y pruebas chi-cuadrado para comparar las 4 categorías embrionarias respecto a implantación 100% y 0% empleando el paquete estadístico SPSS.

## Resultados

Las Tablas I-IV muestran los resultados de los 4 centros, respecto a las frecuencias obtenidas en los embriones transferidos en cada una de las 4 categorías de la Clasificación ASEBIR (A, B, C y D) referidas a 100% implantación y no gestación. Tras el análisis estadístico pudimos observar que existían unas diferencias altamente significativas entre las 4 categorías de catalogación embrionaria en los 4 centros:

### TABLAS:

Tabla I. Centro número 1

CATEGORÍA	100% IMPL.	%	NO GEST.	%
A	30	58,8%	74	36,3%
B	15	29,4%	37	18,1%
C	5	9,8%	44	21,6%
D	1	2%	49	24%
<b>Total emb. transf.</b>	<b>51</b>		<b>204</b>	

Tabla III. Centro número 3

CATEGORÍA	100% IMPL.	%	NO GEST.	%
A	102	74%	214	44,6%
B	17	12,3%	123	25,6%
C	10	7,2%	76	15,8%
D	9	6,5%	67	14%
<b>Total emb. transf</b>	<b>138</b>		<b>480</b>	

Tabla II. Centro número 2

CATEGORÍA	100% IMPL.	%	NO GEST.	%
A	106	50,7%	148	26,8%
B	53	25,4%	113	20,4%
C	47	22,5%	185	33,5%
D	3	1,4%	107	19,3%
<b>Total emb. transf</b>	<b>209</b>		<b>553</b>	

Tabla IV. Centro número 4

CATEGORÍA	100% IMPL.	%	NO GEST.	%
A	62	54,4%	122	39,7%
B	32	28,1%	46	15%
C	20	17,5%	71	23,1%
D	0	0%	68	22,2%
<b>Total emb. transf</b>	<b>114</b>		<b>307</b>	

número 1:  $P=0,000$ ; número 2.  $P=0,000$ ; número 3:  $P=0,000$  y número 4:  $P=0,000$ . Incluyendo todos los datos, el porcentaje de embriones que implantaron en cada categoría fue el siguiente:

A: 35% (300/858); B: 26,8% (117/436); C: 17,9% (82/458) y, finalmente, sólo 13 embriones de un total de 304 (4,3%) catalogados como tipo D, consiguieron implantar.

## Discusión

Las observaciones que se realizan sobre un preembrión a lo largo de su desarrollo preimplantacional nos aportan información relevante para su clasificación y la asignación de unas probabilidades de implantación que nos deben servir para tomar decisiones respecto a su transferencia o congelación. Como hemos comentado, el sistema evaluado aquí trata de establecer un sistema de gradación en 4 categorías. No obstante, la decisión sobre qué hacer con un preembrión de determinada categoría es una opción de cada laboratorio en particular.

La comparación de transferencias de 100% versus 0% implantación en las diferentes categorías de clasificación embrionaria es una forma correcta de ver si nuestro sistema de clasificación es eficaz, y se ajusta o no a las necesidades de nuestro laboratorio o centro de reproducción. Los resultados presentados en este resumen muestran una significativa diferencia entre las 4 categorías evaluadas, mostrando un claro descenso del potencial implantatorio a medida que disminuye la calidad embrionaria y pasamos de una categoría a otra. Podemos decir, por tanto, que se trata de un buen sistema de catalogación embrionaria, el cual tiene en cuenta todos aquellos parámetros que actualmente se consideran importantes en la valoración de la morfología embrionaria (ASEBIR, Cuadernos de Embriología Clínica nº2).

Es importante la validación de este sistema de clasificación por todos aquellos laboratorios que quieran utilizarlo, comparándolo con sus propios criterios de clasificación y contrastando si efectivamente han incrementado su eficacia. El empleo de un sistema común o estándar de clasificación como el presentado aquí, nos permitiría comparar datos de diferentes centros y realizar estudios multicéntricos sin tener que plantearnos dudas sobre los criterios usados.

También hay que seguir profundizando en la clasificación de los preembriones de la manera más precisa posible y así poder evitar en la medida de lo posible el tan temido embarazo múltiple. Es interesante la valoración de otros parámetros clínicos muy importantes, como es la tasa de aborto y el porcentaje de niño nacido vivo y sano. En este sentido, resultados preliminares muestran como los preembriones catalogados por nuestro sistema de clasificación como C y D, después de producir su implantación, tienen mayor riesgo de abortar.

La constante publicación de trabajos en los que se tienen en cuenta aspectos morfológicos incluso a nivel de ovocito, hacen que los sistemas de clasificación sean dinámicos y puedan sufrir pequeños cambios o modificaciones que mejoren y hagan más eficaces los sistemas de clasificación. Desde el Grupo de Interés en Calidad Embrionaria de ASEBIR trabajamos para intentar aportar más claridad a este tema tan importante en todo centro de reproducción asistida.

## Bibliografía

Torelló MJ, Colomar A, Tur R, Aururell R, Veiga A y Barri PN. XXVI Sociedad Española de Fertilidad; 2006; Zaragoza, España.

ASEBIR, "Cuadernos de Embriología Clínica". II Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos. 2007, Edita ASEBIR.

## DATOS PARA LA NORMALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN HUMANA

M<sup>a</sup> José de los Santos

Comisión "Estandarización de los Indicadores de Resultados en el Laboratorio de Reproducción Asistida". Correo electrónico: [mjdelos-santos@ivi.es](mailto:mjdelos-santos@ivi.es)

Coordinadora de la Comisión: M<sup>a</sup> José de los Santos y ponentes de la misma: Manuel Ardoy, José Antonio Castilla y Emilio Gómez. Con la colaboración del grupo de Interés de Calidad Embrionaria: presidente del Grupo de Interés Jorge Cuadros; coordinadores: Manuel Ardoy y Gloria Calderón, y ponentes: Raquel Herrer, M<sup>a</sup> José Figueroa, Juan Manuel Moreno, Águeda Ortiz, Fernando Prados, Luz Rodríguez, Josep Santaló, M<sup>a</sup> José de los Santos, Jorge Ten y M<sup>a</sup> José Torelló.

### Presentación

Desde la plataforma de la junta directiva de ASEBIR se crearon distintas comisiones encaminadas a conseguir consenso en los diferentes aspectos del campo de la embriología clínica. Es este marco, surgió junto con la comisión de "Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de oocito a blastocisto", otra comisión muy afín denominada "Registro del laboratorio de reproducción asistida" que posteriormente pasó a denominarse "Estandarización de los indicadores de resultados en el laboratorio de reproducción asistida" a través de la cual se ha elaborado el presente documento.

Dicha comisión tenía dos objetivos principales, el primero correspondía a la necesidad de normalización de los formatos de presentación de los resultados de las tareas que se realizan en los laboratorios de andrología y embriología clínica. Este primer objetivo obedecía a la carestía de un lenguaje común en eventos científicos o situaciones similares. El segundo objetivo pretendía que, una vez establecidos los formatos de presentación de los resultados, se eligieran los marcadores o indicadores de calidad que ayudaran a definir la excelencia en la práctica de dichas tareas.

El contenido del presente documento muestra el primer objetivo, a partir de él se mostrará y discutirá en el ámbito del congreso algunos de los indicadores que pueden ser considerados como marcadores de calidad en los laboratorios de reproducción humana.

### LABORATORIO DE ANDROLOGÍA DATOS REFERENTES AL LABORATORIO

Número total de inseminaciones

Número total de espermatozoides inseminados (en la 1ª inseminación)\*

Fórmula: [número de espermatozoides (a+b) mill/mL] x volumen inseminado

### INSEMINACIONES CON SEMEN DE DONANTE

Número total de inseminaciones

Número total de espermatozoides inseminados (en la 1ª inseminación)\*

Fórmula: [número de espermatozoides (a+b) mill/mL ] x volumen inseminado

### PORCENTAJE DE REM

Fórmula: [nº total de espermatozoides a+b recuperados/ nº total de espermatozoides a+b iniciales] x100

### TEST DE DESCONGELACIÓN

Fórmula: [porcentaje de espermatozoides a+b tras descongelación/ porcentaje de espermatozoides a+b en fresco] x100

\*NOTA: en centros donde se realicen dos o más inseminaciones se pondrá el número total de espermatozoides inseminados en el total de las inseminaciones

### DATOS REFERENTES A GESTACIÓN POR INSEMINACIÓN

PORCENTAJE DE PRUEBAS DE EMBARAZO POSITIVAS

De los Santos M.J. et al., Datos para la Normalización...

18

Fórmula: (nº total de ciclos de inseminación con bhCG sérica positiva / nº total de ciclos de inseminación) x100

**PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA**

Fórmula: (nº total de ciclos de inseminación con gestaciones con saco / nº total de ciclos de inseminación) x100

Porcentaje de gestación única. Fórmula: (nº total de gestaciones con un único saco / nº total de ciclos de inseminación)x100

Porcentaje de gestación gemelar. Fórmula: (nº total de gestaciones con dos sacos / nº total de ciclos de inseminación) x100

Porcentaje de gestación multifetal. Fórmula: (nº total de gestaciones con tres o más sacos / nº total de ciclos de inseminación) x100

**PORCENTAJE DE ABORTO**

Fórmula: (nº total de abortos / nº total de gestaciones clínicas) x100

**LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA DATOS REFERENTES A PUNCIÓN FOLICULAR (oocitos)****PORCENTAJE DE CASOS SIN OOCITOS**

Fórmula: (nº total de punciones sin oocitos / nº total de punciones) x100

**MEDIA DEL Nº DE OOCITOS OBTENIDOS POR PUNCIÓN**

Fórmula: nº total de oocitos/nº total de punciones

**MEDIA DEL Nº DE OOCITOS MII POR PUNCIÓN (SÓLO CICLOS DE ICSI)**

Fórmula: nº total oocitos MII/ nº total de punciones

**PORCENTAJE DE OOCITOS MII (SÓLO CICLOS DE ICSI)**

Fórmula: (nº total de oocitos MII / nº total de oocitos obtenidos para ICSI) x100

**DATOS REFERENTES A FIV CONVENCIONAL****PORCENTAJE DE PUNCIÓNES DE FIV**

Fórmula: (nº total de punciones de FIV / nº total punciones) x100

**MEDIA OOCITOS INSEMINADOS POR PUNCIÓN**

Fórmula: nº total oocitos inseminados / nº total punciones FIV

**PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN**

Porcentaje de fecundación normal. Fórmula: [nº total de oocitos fecundados (2CP2PN) / nº total de oocitos inseminados] x100

Media del porcentaje de fecundación normal por punción. Fórmula: ( $\Sigma$  porcentaje de fecundación normal por punción / nº total de punciones)

Porcentaje de fecundación anómala (incluye los poliploides). Fórmula: [nº total de oocitos  $\neq$  (2CP2PN) / nº total de oocitos inseminados] x100

Porcentaje de fecundación poliploide. Fórmula: (nº total de oocitos > 3PN / nº total de oocitos inseminados) x100

**PORCENTAJE DE FALLO TOTAL DE FECUNDACIÓN NORMAL**

Fórmula: (nº total de punciones con fallo total de fecundación normal / nº total punciones con inseminación) x100

**PORCENTAJE DE PUNCIÓNES CON TODOS LOS OOCITOS CON FECUNDACIÓN ANÓMALA**

Fórmula: (nº total de ciclos con sólo fecundación anómala / nº total punciones con inseminación) x100

**DATOS REFERENTES A ICSI****PORCENTAJE DE PUNCIÓNES DE ICSI**

Fórmula: (nº total de punciones de ICSI / nº total punciones) x100

**MEDIA DE OOCITOS INYECTADOS POR PUNCIÓN**

Fórmula: nº total oocitos inyectados por punción / nº total punciones ICSI

**PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN**

Porcentaje de fecundación normal. Fórmula: [nº total de oocitos fecundados (2CP2PN) / nº total de oocitos inyectados] x100

Media del porcentaje de fecundación normal por punción. Fórmula:  $(\sum \text{porcentaje de fecundación normal por punción de ICSI} / \text{n}^\circ \text{ total de punciones de ICSI})$

Porcentaje de fecundación anómala (incluye los poliploides). Fórmula:  $[\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} \neq (2\text{CP}2\text{PN}) / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}] \times 100$

Porcentaje de fecundación poliploide. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} > 3\text{PN} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}) \times 100$

Porcentaje de fallo total de fecundación normal. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones con fallo total de fecundación normal} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de ICSI}) \times 100$

#### PORCENTAJE DE PUNCIONES CON TODO FECUNDACIÓN ANÓMALA

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones con sólo fecundación anómala} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de ICSI}) \times 100$

#### PORCENTAJE DE DEGENERACIÓN

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos degenerados en d0+d1} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}) \times 100$

#### DATOS REFERENTES A FIV-ICSI (mixta)

##### PORCENTAJE DE PUNCIONES DE FIV-ICSI

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de ciclos de FIV-ICSI} / \text{n}^\circ \text{ total punciones}) \times 100$

##### MEDIA OOCITOS INSEMINADOS POR PUNCIÓN

Fórmula:  $\text{n}^\circ \text{ total oocitos inseminados} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de FIV-ICSI}$

##### PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN

Porcentaje de fecundación normal. Fórmula:  $[\text{n}^\circ \text{ total de oocitos fecundados (2CP2PN)} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inseminados}] \times 100$

Media del porcentaje de fecundación normal por punción. Fórmula:  $(\sum \text{porcentaje de fecundación normal por punción de FIV-ICSI} / \text{n}^\circ \text{ total de punciones de FIV-ICSI})$

Porcentaje de fecundación anómala (incluye los poliploides). Fórmula:  $[\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} \neq (2\text{CP}2\text{PN}) / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inseminados}] \times 100$

Porcentaje de fecundación poliploide. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} > 3\text{PN} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inseminados}) \times 100$

##### PORCENTAJE DE FALLO TOTAL DE FECUNDACIÓN NORMAL

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones con fallo total de fecundación normal} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de FIV-ICSI con inseminación}) \times 100$

##### PORCENTAJE DE PUNCIONES CON TODOS LOS OOCITOS CON FECUNDACIÓN ANÓMALA

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de ciclos con sólo fecundación anómala} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de FIV-ICSI con inseminación}) \times 100$

##### MEDIA DE OOCITOS INYECTADOS POR PUNCIÓN

Fórmula:  $\text{n}^\circ \text{ total oocitos inyectados} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de FIV-ICSI}$

##### PORCENTAJE DE FECUNDACIÓN

Porcentaje de fecundación normal. Fórmula:  $[\text{n}^\circ \text{ total de oocitos fecundados (2CP2PN)} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}] \times 100$

Media del porcentaje de fecundación normal por punción. Fórmula:  $(\sum \text{porcentaje de fecundación normal} / \text{n}^\circ \text{ total de punciones de FIV-ICSI})$

Porcentaje de fecundación anómala (incluye los poliploides). Fórmula:  $[\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} \neq (2\text{CP}2\text{PN}) / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}] \times 100$

Porcentaje de fecundación poliploide. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} > 3\text{PN} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}) \times 100$

Porcentaje de fallo total de fecundación normal. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones con fallo total de fecundación normal} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de ICSI}) \times 100$

##### PORCENTAJE DE PUNCIONES CON TODO FECUNDACIÓN ANÓMALA

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones con sólo fecundación anómala} / \text{n}^\circ \text{ total punciones de ICSI}) \times 100$

##### PORCENTAJE DE DEGENERACIÓN

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos degenerados en d0+d1} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos inyectados}) \times 100$

De los Santos M.J. et al., Datos para la Normalización...

20

PORCENTAJE DE FALLO TOTAL DE FECUNDACIÓN NORMAL GLOBAL (EN FIV E ICSI)

Fórmula: (nº total de punciones con fallo total de fecundación (OPN) / nº total punciones de FIV-ICSI) x100

PORCENTAJE DE PUNCIONES CON TODO FECUNDACIÓN ANÓMALA (EN FIV E ICSI)

Fórmula: (nº total de punciones con sólo fecundación anómala / nº total punciones de FIV-ICSI) x100

#### DATOS REFERENTES A EMBRIONES

PORCENTAJE DIVISIÓN TEMPRANA

Fórmula: [nº total de oocitos divididos a las 25-27 horas / nº total de cigotos (2CP2PN)] x100

PORCENTAJE BLOQUEO EN PN (o D+1)

Fórmula: [nº total de embriones sin signos de división celular (44-47 h post inseminación / nº total cigotos (2CP2PN)] x100

PORCENTAJE BLOQUEO EN D+2

Fórmula: (nº total de embriones en d3 con el mismo número de blastómeros en d2 / nº total de embriones en d2) x100

PORCENTAJE BLOQUEO EN CULTIVO PROLONGADO

Fórmula: (nº total de embriones que no han alcanzado el estadio de blastocisto en D+5 y/o D+6 / nº total de embriones) x100

#### DATOS DE CALIDAD EMBRIONARIA (general)

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA A

Fórmula: (nº total de embriones de categoría A / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA B

Fórmula: (nº total de embriones de categoría B / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA C

Fórmula: (nº total de embriones de categoría C / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA D

Fórmula: (nº total de embriones de categoría D / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA A

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría A / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA B

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría B / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA C

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría C / nº total de embriones) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA D

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría D / nº total de embriones) x100

#### DATOS REFERENTES A CALIDAD EMBRIONARIA (transferencia)

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA A

Fórmula: (nº total de embriones de categoría A transferidos / nº total de embriones transferidos) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA B

Fórmula: (nº total de embriones de categoría B transferidos / nº total de embriones transferidos) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA C

Fórmula: (nº total de embriones de categoría C transferidos / nº total de embriones transferidos) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES DE D+2 O D+3 DE CATEGORÍA D

Fórmula: (nº total de embriones de categoría D transferidos/ nº total de embriones transferidos) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA A

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría A transferidos / nº total de blastocistos transferidos) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA B

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría B transferidos / nº total de blastocistos transferidos) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA C

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría C transferidos / nº total de blastocistos transferidos) x100

PORCENTAJE DE BLASTOCISTOS EN D+5 Y/O D+6 DE CATEGORÍA D

Fórmula: (nº total de blastocistos de categoría D transferidos / nº total de blastocistos transferidos) x100

NÚMERO MEDIO DE EMBRIONES POR TRANSFERENCIA

Fórmula: nº total de embriones transferidos / nº total de transferencias embrionarias

PORCENTAJE DE CASOS DE NO TRANSFERENCIA

Fórmula: (nº total de punciones sin transferencia / nº total de punciones) x100

### DATOS REFERENTES A GESTACIÓN

PORCENTAJE DE PRUEBAS DE EMBARAZO POSITIVAS / PUNCIÓN

Fórmula : (nº total de casos con bhCG sérica positiva / nº total de punciones) x100

PORCENTAJE DE PRUEBAS DE EMBARAZO POSITIVAS / TRANSFERENCIA

Fórmula : (nº total de casos con bhCG sérica positiva / nº total de transferencias) X100

PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA / PUNCIÓN

Fórmula : (nº total de gestaciones con saco / nº total de punciones) x100

PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA / TRANSFERENCIA

Fórmula: (nº total de gestaciones con saco / nº total de transferencias) x100

Porcentaje de gestación única. Fórmula: (nº total de gestaciones con un único saco / nº total de gestaciones) x100

Porcentaje de gestación gemelar. Fórmula: (nº total de gestaciones con dos sacos / nº total de gestaciones) x100

Porcentaje de gestación multifetal. Fórmula: (nº total de gestaciones con tres o más sacos / nº total de gestaciones) x100

Porcentaje de gestación gemelar monozigótica. Fórmula: (nº total de gestaciones con más sacos que embriones transferidos / nº total de gestaciones) x100

PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA / OOCITO

Fórmula: (nº total de gestaciones con saco / nº total de oocitos obtenidos por punción) x100

PORCENTAJE DE ABORTO

Fórmula: (nº total de abortos / nº total de gestaciones con saco) x100

PORCENTAJE DE IMPLANTACIÓN

Fórmula: (nº de sacos observados / nº de embriones transferidos) x100

PORCENTAJE DE RNV / PUNCIÓN

Fórmula: (nº total de niños nacidos / nº total de punciones) x100

PORCENTAJE DE RNV / TRANSFERENCIA

Fórmula: (nº total de niños nacidos / nº total de transferencias) x100

PORCENTAJE DE RNV / OOCITO

Fórmula: (nº total de niños nacidos / nº total de oocitos) x100

### DATOS REFERENTES A LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

PORCENTAJE DE PUNCIÓNES CON EMBRIONES CONGELADOS

Fórmula: (nº total de punciones con algún embrión congelado / nº total de punciones) x100

PORCENTAJE DE EMBRIONES CONGELADOS

Fórmula: (nº total de embriones congelados / nº total de embriones obtenidos) x100

De los Santos M.J. et al., Datos para la Normalización...

22

**SUPERVIVENCIA (ZIGOTOS)**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total zigotos intactos} / \text{n}^\circ \text{ total de zigotos descongelados}) \times 100$ **SUPERVIVENCIA GENERAL (EMBRIONES D2/D3)**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total embriones con } \geq 50\% \text{ blastómeros intactos} / \text{n}^\circ \text{ total de embriones descongelados}) \times 100$ **SUPERVIVENCIA ESPECIAL (EMBRIONES D2/D3)**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total embriones con } 100\% \text{ de los blastómeros intactos} / \text{n}^\circ \text{ total de embriones descongelados}) \times 100$ **SUPERVIVENCIA (BLASTOCISTOS)**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total blastocistos con signos de expansión tras } 18\text{-}20 \text{ h post descongelación} / \text{n}^\circ \text{ total de blastocistos descongelados}) \times 100$ **PORCENTAJE DE TRANSFERENCIAS**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de criotransferencias} / \text{n}^\circ \text{ total de descongelaciones}) \times 100$ **MEDIA DE EMBRIONES TRANSFERIDOS**Fórmula:  $\text{n}^\circ \text{ total de embriones transferidos} / \text{n}^\circ \text{ total de transferencias}$ **DATOS REFERENTES A LA GESTACIÓN (criopreservación)****PORCENTAJE DE PRUEBAS DE EMBARAZO POSITIVAS / DESCONGELACIÓN**Fórmula :  $(\text{n}^\circ \text{ total de casos con bhCG sérica positiva} / \text{n}^\circ \text{ total de descongelaciones}) \times 100$ **PORCENTAJE DE PRUEBAS DE EMBARAZO POSITIVAS / CRIOTRANSFERENCIAS**Fórmula :  $(\text{n}^\circ \text{ total de casos con bhCG sérica positiva} / \text{n}^\circ \text{ total de criotransferencias}) \times 100$ **PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA / DESCONGELACIÓN**Fórmula :  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con saco} / \text{n}^\circ \text{ total de descongelaciones}) \times 100$ **PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA / CRIOTRANSFERENCIAS**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con saco} / \text{n}^\circ \text{ total de criotransferencias}) \times 100$ Porcentaje de gestación única. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con un único saco} / \text{n}^\circ \text{ total de gestaciones}) \times 100$ Porcentaje de gestación gemelar. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con dos sacos} / \text{n}^\circ \text{ total de gestaciones}) \times 100$ Porcentaje de gestación multifetal. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con tres o más sacos} / \text{n}^\circ \text{ total de gestaciones}) \times 100$ Porcentaje de gestación gemelar monozigótica. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con más sacos que embriones transferidos} / \text{n}^\circ \text{ total de gestaciones}) \times 100$ **PORCENTAJE DE GESTACIÓN CLÍNICA / ACUMULADA**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con saco en el ciclo en fresco o en el ciclo de congelados} / \text{punción}) \times 100$ **PORCENTAJE DE ABORTO**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total abortos clínicos} / \text{n}^\circ \text{ total de gestaciones con saco}) \times 100$ **PORCENTAJE DE IMPLANTACIÓN**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ sacos observados} / \text{n}^\circ \text{ de embriones transferidos}) \times 100$ **PORCENTAJE DE IMPLANTACIÓN POR EMBRIÓN DESCONGELADO**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ sacos observados} / \text{n}^\circ \text{ de embriones descongelados}) \times 100$ **PORCENTAJE DE RNV / DESCONGELACIÓN**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total niños nacidos} / \text{n}^\circ \text{ total de descongelaciones}) \times 100$ **PORCENTAJE DE RNV / CRIOTRANSFERENCIA**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total niños nacidos} / \text{n}^\circ \text{ total de criotransferencias}) \times 100$ **PORCENTAJE DE RNV/EMBRION DESCONGELADO**Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total niños nacidos} / \text{n}^\circ \text{ total de embriones descongelados}) \times 100$

**DATOS REFERENTES A CRIOPRESERVACIÓN DE OOCITOS**

Porcentaje de punciones con oocitos (MII) congelados. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones con oocitos congelados} / \text{n}^\circ \text{ total de punciones}) \times 100$

Porcentaje oocitos congelados. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos MII congelados} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos obtenidos por punción}) \times 100$

Supervivencia. Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total oocitos intactos a las dos horas de la descongelación} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos descongelados}) \times 100$

NOTA: Datos referentes a la técnica de inseminación, desarrollo embrionario, y gestación generados a partir de las técnicas de congelación de oocitos, se realizarán utilizando las fórmulas descritas en los apartados anteriores.

**DATOS REFERENTES A ECLOSIÓN ASISTIDA - ELIMINACIÓN DE FRAGMENTOS (EA - EF)**

PORCENTAJE DE TRANSFERENCIAS EN LAS QUE SE REALIZA EA - EF

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de transferencias con embriones a los que se les realiza EA-EF} / \text{n}^\circ \text{ total de transferencias}) \times 100$

PORCENTAJE EMBRIONES TRATADOS MEDIANTE EA-EF

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de embriones tratados con EA-EF} / \text{n}^\circ \text{ total de embriones transferidos}) \times 100$

PORCENTAJE EMBRIONES INTACTOS TRAS EA - EF

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de embriones intactos tras EA - EF} / \text{n}^\circ \text{ total de embriones tratados con EA - EF}) \times 100$

NOTA: Datos referentes al desarrollo embrionario, y gestación generados a partir de las técnicas de EA - EF, se realizarán utilizando las fórmulas descritas en los apartados anteriores.

**DATOS REFERENTES A LA MADURACIÓN DE OOCITOS *IN VITRO* (MIV)**

PORCENTAJE DE PUNCIONES CON MIV

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de punciones MIV} / \text{n}^\circ \text{ total de punciones}) \times 100$

PORCENTAJE OOCITOS RECUPERADOS

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos} / \text{n}^\circ \text{ total de folículos aspirados}) \times 100$

PORCENTAJE OOCITOS RECUPERADOS EN VG

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos en VG recuperados el día de punción} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos recuperados}) \times 100$

PORCENTAJE OOCITOS RECUPERADOS EN MI

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos en MI recuperados el día de punción} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos recuperados}) \times 100$

PORCENTAJE OOCITOS RECUPERADOS EN MII

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos en MII} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos recuperados}) \times 100$

PORCENTAJE DE MADURACIÓN 24 HORAS

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos que maduran a MII a las 24 horas} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos recuperados en estadio de PI o MI}) \times 100$

PORCENTAJE DE MADURACIÓN 48 HORAS

Fórmula:  $(\text{n}^\circ \text{ total de oocitos que maduran a MII a las 48 horas} / \text{n}^\circ \text{ total de oocitos recuperados en estadio de PI o MI}) \times 100$

NOTA: Datos relacionados con las técnica de inseminación, desarrollo embrionario, y gestación generados a partir de los oocitos obtenidos mediante MIV, se realizarán utilizando las fórmulas descritas en los apartados anteriores.

## PROYECTOS DE FUTURO DEL GRUPO DE INTERÉS “CALIDAD EMBRIONARIA”

**Jorge Cuadros**

**Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIVMadrid.**

**Correo electrónico: jcuadros@fivmadrid.es**

Para el embriólogo clínico, la selección de los embriones con mayor potencial de implantación para la transferencia es uno de los objetivos fundamentales para alcanzar tasas de gestación óptimas. En la actualidad, la manera usual de realizar esta selección es a través de las características morfológicas de los embriones. Si bien es verdad que existen otras herramientas, como determinar el consumo metabólico de los embriones o la detección de aneuploidías, estas opciones aún no son de uso rutinario.

Sin embargo, los parámetros morfológicos que pueden ser analizados en el embrión humano, desde el cigoto hasta el blastocisto (y aún antes, en el oocito o el espermatozoide) son muy diversos y su análisis es tan complejo, que establecer una herramienta de trabajo que permita realizar esta selección de una manera sencilla, rápida y objetiva es muy difícil, tan difícil que no existe en el mundo un sistema de selección embrionaria universalmente aceptado. Lo hubo, quizás, durante el tiempo en que estuvimos utilizando la clasificación de Lucinda Veek de los embriones de grado 1 a grado 5. Sin embargo, aunque aún solemos recurrir a esta clasificación de manera coloquial, tenemos claro que el conocimiento actual del embrión humano nos aleja cada vez más de la sencillez de dicha clasificación.

Por estos motivos, en 2004, y ante la necesidad de una herramienta que nos permitiera a los embriólogos clínicos comunicarnos entre nosotros, así como comunicar nuestros estudios en congresos y publicaciones, la Junta Directiva de ASEBIR decidió nombrar la Comisión de “Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de oocito a blastocisto”. Manuel Ardoy y Gloria Calderón fueron los encargados de organizar y coordinar el trabajo de diez embriólogos de centros de reproducción asistida de toda España.

El trabajo de la comisión finalizó con la presentación en el Congreso de Zaragoza de 2005 de la ponencia presentada por M<sup>a</sup> Jose Torelló, “Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos” donde se presentó el consenso alcanzado por los miembros de la comisión respecto de las características de los embriones que deberían ser tenidas en cuenta para realizar una selección adecuada para la transferencia. Recientemente, este consenso ha sido publicado en el II Cuaderno de Embriología Clínica de ASEBIR y, aunque la utilidad de esta herramienta debe aún ser demostrada, algunas de las virtudes que se pueden destacar de este trabajo son las siguientes:

-Es un consenso de mínimos. Los embriólogos clínicos pueden echar en falta algunas características que podrían estar utilizando de forma rutinaria en sus laboratorios. Sin embargo, es probable que la mayoría esté de acuerdo en que los parámetros que han sido escogidos son determinantes de la calidad del embrión.

-Ante la alternativa de diseñar un sistema de categorías o un sistema de puntuación (*score*), la Comisión decidió optar por la primera, ya que, como punto de partida, nos pareció la manera más directa de alcanzar el consenso deseado.

-Los parámetros han sido elegidos fundamentalmente en base a las referencias bibliográficas, habiendo consultado inclusive con algunos autores como Thorir Hardarson, Nina Desai y Eric Van Royen. Por otro lado, además de la propia experiencia de los miembros de la comisión, para elegir los parámetros de selección adecuados se realizó una encuesta en la que participaron centros de reproducción asistida de toda España.

-Algunos de los criterios que no se ha podido demostrar que sean determinantes de la calidad embrionaria, se han incluido como recomendaciones a tener en cuenta para distinguir entre embriones de calidad similar, como la presencia de células uninucleadas, el inicio de adhesión en D+3 o la presencia de *pitting* o "moteado".

Sin embargo, una vez que la comisión cumplió el encargo que se le había hecho, una de las primeras conclusiones a las que llegamos los miembros fue que el trabajo no sólo no había terminado, sino que, más bien, estábamos en el inicio de una tarea que requeriría mucho más tiempo que el fijado para el trabajo de la comisión.

Por este motivo, los miembros de la Comisión "Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de oocito a blastocisto" solicitamos a la Junta Directiva de ASEBIR la constitución de un nuevo Grupo de Interés, denominado "Calidad Embrionaria", con el objetivo de continuar el trabajo iniciado por la Comisión y resolver los problemas que pudieran ir surgiendo de la aplicación de este nuevo sistema de clasificación de la calidad embrionaria.

Si bien aún estamos pendientes de estudios que validen la utilidad de esta herramienta, la información que nos ha ido llegando durante el último año nos hace pensar que el sistema de categorización embrionaria de ASEBIR ha tenido una buena acogida. Sin embargo, como era de esperar, han surgido dudas, tanto en los centros donde ha empezado a aplicarse, como en el seno mismo del grupo de interés. Esto es, de hecho, lo que justifica la existencia del grupo: intentar que el sistema de clasificación refleje de la mejor manera posible el potencial de implantación del embrión, para lo cual debemos continuar aprendiendo del embrión y de sus características morfo-fisiológicas, haciendo los cambios que fueran necesarios al sistema de categorización.

Algunas de las dudas y posibles modificaciones que se podrían hacer al sistema tienen que ver con las recomendaciones dadas en el II Cuaderno de Embriología Clínica de ASEBIR y con algunos de los parámetros morfológicos ya considerados, cuya importancia puede suscitar controversias. También se pueden revisar los criterios morfológicos que en la literatura no alcanzan a demostrar su influencia sobre la calidad embrionaria. Hay que tener en cuenta que para resolver estas dudas también es crucial la información que recibamos desde los centros en los que se utilice el sistema, más aún si es a través de estudios que evalúen su eficacia.

De estos aspectos que en el futuro podrían ser analizados en el Grupo de Interés “Calidad Embrionaria” podríamos considerar los siguientes:

-Parámetros morfológicos de oocitos y cigotos. De momento, en el sistema de clasificación embrionaria de ASEBIR las características de los oocitos y cigotos se encuentran aún en el terreno de las recomendaciones, debido sobre todo a la falta de información en la literatura o a resultados contradictorios. Esto justificaría la realización de estudios originales.

-Adaptación del sistema de clasificación a los embriones descongelados. Importante sobre todo en la descongelación de blastocistos.

-Valoración del inicio de adhesión en D+3. Aún cuando recientemente se está considerando este parámetro como de buen pronóstico si ocurre cuando el embrión tiene 7 o más células, su dependencia de protocolos y medios de cultivo hace que hasta el momento sea difícil llegar a conclusiones al respecto. Debería ser estudiado de forma prospectiva.

-Valoración de las células multinucleadas. El hecho de que haya algunos nacimientos a partir de embriones con células multinucleadas podría aconsejar la evaluación de la probabilidad de embarazo a partir de estos embriones, comparándola con la probabilidad de pérdidas tempranas o abortos. Además, se debería distinguir entre blastómeras con 3 o más núcleos (multinucleadas) y blastómeras con 2 núcleos (binucleadas), ya que sus probabilidades de generar un niño sano podrían ser diferentes. De la misma manera, habría que diferenciar entre multinucleación en D+2 o en D+3.

-no deberíamos descartar la posibilidad de convertir el sistema de categorización en un algoritmo matemático que permita una puntuación rápida y eficaz. Hasta el momento, los *scores* existentes son muy arbitrarios, y convertir un sistema de categorías en un sistema de puntuación no sería una tarea fácil; pero, de ser posible, facilitaría enormemente la clasificación embrionaria.

-además, se está considerando difundir este trabajo a nivel europeo, debido a que la falta de una herramienta reconocida de forma general es un problema que es común para todos los embriólogos clínicos.

Estos son algunos de los objetivos a corto y medio plazo del grupo de interés “Calidad Embrionaria”, objetivos que deberían ir adecuándose al avance de los conocimientos sobre el embrión humano.

En su momento, cuando iniciamos el trabajo de la comisión, nuestra tarea parecía pretenciosa; sin embargo, ahora que contamos con un consenso básico, quizás el objetivo final planteado de conseguir “el sistema” que nos permita hablar el mismo idioma ya no sea una posibilidad remota, sino más bien un proyecto ambicioso, pero factible.

## REALIDAD DIAGNÓSTICA DEL DGP (GRUPO DE INTERÉS DEL DGP)

**Esther Fernández**

Laboratorio de Reproducción Asistida y Genética Reproductiva, Hospital Quirón Madrid.

Correo electrónico: [efernandezg.mad@quiron.es](mailto:efernandezg.mad@quiron.es)

### Introducción

Los avances en las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) y genética molecular, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1985) y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Brown and Evans, 1992), nos han permitido desarrollar la forma más precoz de Diagnóstico Prenatal (DP), lo que hoy conocemos como Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP).

Con el DGP, los embriones obtenidos mediante la FIV pueden ser analizados en busca de alteraciones cromosómicas o enfermedades genéticas graves, seleccionando aquellos embriones sanos o cromosómicamente normales antes de la transferencia al útero materno y por tanto, antes de que se haya producido la implantación. El DGP representa para las parejas portadoras de alteraciones genéticas graves, la única alternativa a la interrupción del embarazo después de un DP de feto afecto.

Aunque la idea del DGP no es nueva, (Edwards and Gardner, 1968), sin embargo tendríamos que esperar más de dos décadas hasta ver publicado en 1990 el primer embarazo en una pareja portadora de una enfermedad ligada al sexo (Handyside et al., 1990). Esta tecnología utilizada por primera vez para seleccionar el sexo del embrión, ha ido ampliando sus indicaciones aplicándose en enfermedades monogénicas y anomalías cromosómicas estructurales, siendo una técnica consolidada y de aplicación rutinaria en muchos de nuestros centros de Reproducción Asistida.

La aplicación de esta técnica es especialmente importante en medicina reproductiva, debido a la frecuente asociación entre la esterilidad y los factores genéticos. Las anomalías cromosómicas son la causa más importante de la esterilidad, la infertilidad y el elevado porcentaje de mortalidad en el proceso reproductivo humano. Los datos obtenidos en ciclos naturales sugieren que solo la mitad de las concepciones humanas acaban en nacimiento (Edmonds et al., 1982). En este sentido, esta técnica se lleva aplicando de forma mayoritaria en una población de pacientes que tienen un riesgo incrementado de crear embriones aneuploides, tales como mujeres con edad materna avanzada (AMA), parejas con abortos recurrentes (AR) y parejas con fallo recurrente de implantación (FRI) en los programas de FIV, pudiendo analizar mediante el *screening* genético preimplantacional (PGS) las aneuploidías más frecuentes (Munné et al., 1998) y seleccionar los embriones con mayor potencial implantatorio.

### Metodología

La metodología aplicada en los Laboratorios de FIV para llevar a cabo el DGP, pasa primero por elegir

el estadio idóneo para la biopsia embrionaria que dependerá del origen de la anomalía (materna o paterna) y de su naturaleza y por supuesto por la técnica utilizada para llevar a cabo la misma:

1) Biopsia del primer y segundo corpúsculo polar (CP), que se puede realizar sin dañar las tasas de fertilización y división posterior del ovocito. Dado que la mayoría de las aneuploidías humanas se producen durante la primera división meiótica del ovocito, el análisis de primer CP nos permitirá la identificación de la mayoría de los desequilibrios cromosómicos numéricos de origen materno. Para ello se realiza un orificio en la zona pelúcida (ZP) de forma mecánica utilizando una fina aguja, (Velinsky et al., 1991) o mediante la técnica del láser, pudiendo entonces aspirar el CP del ovocito con una pipeta de biopsia.

2) La biopsia de uno o dos blastómeros del embrión, que es la técnica mayoritariamente utilizada. Para ello se deja en cultivo al embrión hasta el día +3 post inseminación (6 o más células). El orificio de la ZP se puede realizar utilizando tres métodos: el mecánico con una fina aguja, el químico con ácido de Tyrode y el Láser. El desarrollo embrionario tras la disección de la ZP varía dependiendo de la metodología utilizada, en un estudio realizado por Chatzimeletiou (2001), en embriones de ratón, demuestra que los embriones con la ZP diseccionada cavitan en general más tarde que los controles, y su desarrollo a estadio de blastocisto se ve mermado drásticamente cuando se utiliza la solución ácida de Tyrode en lugar del láser, afectando a la masa celular interna. A través de la abertura de la ZP, se introduce una pipeta de biopsia en el embrión y uno o dos blastómeros son aspirados suavemente. Una alternativa menos usada es la extrusión del blastómero a través de la abertura de la ZP mediante un apretón en la misma. A la hora de realizar la biopsia existen dos tendencias, una a favor de la biopsia de un blastómero (Cohen et al., 2005) menos perjudicial para el embrión y la otra a favor de la biopsia de dos blastómeros, ya que no afecta a la capacidad de desarrollo a estadio de blastocisto del embrión (Ardí et al., 1990; Staessen et al., 2004). En un estudio realizado por Michiels y colaboradores en 2006, se observa que el análisis de un blastómero genera menos embriones con diagnóstico que el análisis de dos blastómeros, aunque es estadísticamente significativo, este autor afirma que el 2% de diferencia encontrado no tiene relevancia clínica.

3) La biopsia del embrión en estadio de blastocisto, día +5 de cultivo post inseminación. En este caso aunque se tienen más células para el diagnóstico, hay que tener en cuenta que solamente un 36% de embriones evolucionan *in vitro* hasta este estadio y que además contamos con muy poco tiempo para dar el resultado del diagnóstico ya que la transferencia embrionaria se realiza en día +5 o +6.

### Analisis de las células obtenidas

El análisis genético se realiza utilizando la técnica de PCR en el DGP de enfermedades monogénicas (Sermon, 2002), mientras que la técnica de FISH se introdujo para la identificación de los cromosomas sexuales en la determinación del sexo embrionario (Griffin et al., 1991; Veiga et al., 1994) así como para el estudio de anomalías estructurales (Munné et al., 1998).

**PCR.** La PCR se utiliza para amplificar la suficiente cantidad de DNA a partir de las células obtenidas del ovocito y embrión, en el diagnóstico de enfermedades monogénicas. La PCR es una técnica muy sensible y necesita condiciones de trabajo estrictas para evitar la contaminación con DNA exógeno, haciéndose necesario utilizar la ICSI como método de inseminación de los ovocitos. El método de lisis celular y posterior amplificación del DNA de una sola célula será crucial para la obtención de resultados. Se hace necesario el análisis de polimorfismos ligados al gen en cuestión y hay que tener en cuenta el fenómeno de amplificación alelo específica (ADO) que puede alcanzar hasta un 20%, con el fin de evitar errores de diagnóstico. Son varias las técnicas que se introdujeron para minimizar este problema, como la PCR fluorescente y el análisis computerizado de los fragmentos así como la PCR-multiplex, a esto se incorpora la secuenciación y minisequenciación automatizada y la PCR a tiempo real que están mejorando las posibilidades diagnósticas. En cuanto al número de blastómeros para analizar por embrión, está bien establecido el análisis de dos blastómeros siempre que no comprometa la viabilidad del embrión. El error de diagnóstico publicado para esta técnica es anecdótico, haciendo difícil su determinación. Los datos recogidos por el Consorcio europeo de DGP estiman en un 3% de error de diagnóstico en esta técnica (Sermon et al., 2005).

**FISH.** La FISH es método más frecuentemente utilizado para el análisis del complemento cromosómico de los blastómeros. Una vez fijado el núcleo de la célula sobre un porta, podremos usar sondas de DNA marcadas con fluorocromos específicos que nos permitan poner de manifiesto los diferentes cromosomas analizados. El número y tipo de sonda de FISH usada depende de la indicación, pudiendo utilizar solamente dos (X e Y para selección de sexo), así como sondas específicas en traslocaciones y de 5-10 diez cromosomas distintos analizados con dos o tres rondas de hibridación con una eficacia aceptable, para el *screening* genético preimplantacional (PGS). El número de blastómeros a analizar por embrión varía según los grupos de 1 a 2. En las series más largas se ha descrito un nivel de error de la FISH con el análisis de un solo blastómero del 7%, siendo el 6% atribuible al mosaicismo. Debido al fenómeno biológico del mosaicismo el PGS en estadio de 8-células no será nunca totalmente fiable. Baart y colaboradores en 2005, en un estudio realizado en pacientes de FIV <38 años, observa que el porcentaje de embriones mosaicos en día +3 es del 57% y encuentra que la constitución cromosómica de estos embriones está sujeta a cambios durante el desarrollo a estadio de blastocisto. En cuanto al error de diagnóstico de la FISH detectado por el *PGD Consortium* (Sermon et al., 2005) no supera el 1%.

**Hibridación Genómica Comparativa (CGH).** La CGH es otra manera de identificar alteraciones cromosómicas, en este proceso el DNA preamplificado de una única célula se marca con un fluorocromo por ejemplo el rojo, y se mezcla con otro DNA de una muestra control preamplificado y marcado con otro fluorocromo, el verde, con el cual se compara. La ventaja de la CGH sobre el FISH es que podemos analizar todo el complemento cromosómico aunque no podemos detectar poliploidias y traslocaciones equilibradas. Otra desventaja es que este proceso requiere 72 horas, por lo que se utiliza en el CP,

para el análisis materno. La CGH aplicada en los blastómeros obtenidos en día +3, requieren la congelación del embrión y la transferencia en un ciclo posterior. Se sabe que el rango de supervivencia de estos embriones biopsiados es extremadamente bajo (54%). El tiempo podría acortarse si se utiliza en lugar de la metafase un *microarray* con secuencias cuidadosamente elegidas de los 24 cromosomas.

### Indicaciones

El DGP es una técnica que se esta utilizando en dos grupos de indicaciones. El primer grupo la indicación del DGP está dirigida a parejas portadoras de una enfermedad monogénica o alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales, con riesgo de tener un hijo con una enfermedad genética. Estas parejas han optado en repetidas ocasiones por terminar su embarazo despues del resultado de un DP, o bien son estériles por su condición genética (ausencia bilateral de vasos deferentes), o han tenido abortos recurrentes, como ocurre con los portadores de una traslocación.

En cuanto a los resultados publicados en grandes series tenemos por un lado los datos del *PGD Consortium* publicados en 2005, se han realziado 638 ciclos de selección de sexo en enfermedades ligadas al X con una tasa de embarazo por punción del 19%; 1276 ciclos de enfermedades monogénicas con una tasa de embarazo por punción del 20% y 1252 ciclos de alteraciones cromosómicas estructurales con un 15% de embarazo por punción.

La otra serie publicada por Verlisnky y colaboradores en 2004, agrupa los datos de tres equipos en los ultimos 12 años, con 532 ciclos de enfermedades monogénicas y una tasa de embarazo por tranferencia del 30,5% y 469 ciclos de alteraciones cromosómicas estructurales con un 34,6% de embarazo por tranferencia.

Existen una serie de indicaciones genéticas para el DGP, que nunca habían sido contempladas en el DP y que debido a las características de la técnica pueden ser defendidas desde un punto de vista ético y son hoy día objeto de modificación de leyes, como es el caso de la Ley Española (Ley 14/2006) sobre Reproducción Asistida. Enfermedades como el Huntington donde el DGP se aplica en pacientes presintomáticos, pudiendo aplicarse en aquellos pacientes que no quieren conocer su estatus de portador, abren la puerta a otras enfermedades, como a pacientes con genes de predisposición al cancer (BRCA1, BRCA2, Li-Fraumeni, neurofibromatosis 1 y 2). Otra nueva indicación en debate del DGP, implica la selección de embriones de acuerdo a su HLA, de manera que los niños nacidos de estos ciclos de DGP pueden ser donantes de células madres para su hermano enfermo. El primer caso descrito por Verlinsky y colaboradores en 2001, se realizó en una familia con un niño afectado por Anemia de Fanconi, en este caso se seleccionaron embriones no afectados y además HLA compatibles.

El segundo grupo de indicaciones para el DGP, esta formado por aquellas parejas que estan siendo tratadas con técnicas de FIV, que presentan un riesgo genético más bajo y cuyos embriones son analizados para el *screenig* de aneuploidias con el fin mejorar sus posibilidades de obtener un embarazo. Este DGP de *screenig* de aneuploidias (PGD-AS) o *screenig* genético preimplantacional (PGS) se aplicaría en aquellos casos donde las bajas posibilidades de terminar con éxito una FIV, se pueden atribuir a la presencia de aneuploidias en el embrión, como ocurre en ocasiones con las mujeres mayores de 38 años, con las parejas con abortos recurrentes sin causa genética demostrada o con parejas con fallo repetido de implantación en FIV. De hecho este PGS es la técnica mayoritariamente aplicada (Sermon et al., 2005), debido posiblemente a la relativa facilidad de la metodología utilizada, si la comparamos con otras técnicas del DGP y a la gran cantidad de pacientes potenciales. Los datos publicados por el Consorcio en 2005 hablan de un total de 3126 ciclos con una tasa de embarazo por punción del 17%. Mientras que los datos publicados por Verlinsky y colaboradores en 2004 recogen un total de 3747 ciclos con una tasa de embarazo por transferencia del 23,3%.

Mientras que el DGP esta siendo utilizado con éxito como un método de diagnóstico prenatal para el diagnóstico de enfermedades monogénicas y para selección de sexo en enfermedades ligadas al cromosoma X. Su éxito en el *screenig* de aneuploidias debe ser todavía probado.

La citogenética clásica nos muestra que entre el 23 y 80% de los embriones son aneuploides (Zenzes and Casper, 1992; Pellestor et al., 1994). La FISH esta proporcionando alguna información acerca de los tipos de anomalías cromosómicas y su origen. La mayoría de estas anomalías resultan de errores en la meiosis materna, los cuales ocurren preferentemente durante la primera división meiótica. Entre el 15-20% de los ovocitos humanos presentan anomalías cromosómicas debidas tanto a la no disyunción de un cromosoma, como a la separación prematura de cromátides hermanas. En este sentido el efecto de la edad materna avanzada (>35 años) en la incidencia de aneuploidias está claramente evidenciado en los estudios realizados en ovocito, primer y segundo corpúsculo polar, llegando a alcanzar hasta el 52% (Planchot, 2003).

Delhanty y colaboradores en 1993 en DGP de selección de sexo mediante FISH con sondas de los cromosomas X e Y, pudieron observar un alto rango de anomalías, tales como monosomía X, y mosaicismos de trisomía/triploidía. De la misma manera Munné y colaboradores (1993), pudieron observar mediante al análisis por FISH de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21, que el 70% de los embriones que tenían un desarrollo anormal, presentaban al menos alterado un cromosoma de los analizados. En el año 2000, Márquez y cols., presentaron los resultados obtenidos en 1255 embriones no viables, mostrando un incremento de aneuploidias relacionado con la edad materna (1,4% en mujeres de 20-34 años; 52,4% en mujeres de 40-47 años), mientras que la poliploidía y los mosaicismos son independientes de la edad y se relacionan con una pobre morfología embrionaria.

La alta incidencia de anomalías cromosómicas encontradas en ovocitos así como en embriones humanos (Bartels et al., 1990; Strom et al., 1992), hacen pensar que el PGS es una herramienta poderosa para descartar los embriones con anomalías cromosómicas y mejorar en definitiva los resultados de embarazo obtenidos con la FIV en estas pacientes.

El PGS aunque en constante desarrollo tiene sus limitaciones, por una parte el alto grado de mosaicismo que presentan los embriones en estadio de división (Staessen et al., 2004; Baart et al., 2004) y por otra las carencias inherentes a la propia técnica de FISH.

Las principales indicaciones del PGS son la edad materna avanzada (EMA), el aborto recurrente (AR) y el fallo recurrente de implantación (FRI) en FIV. Los estudios realizados en este sentido confirman la alta incidencia de embriones aneuploides tanto en pacientes con EMA (Munné et al., 1999; 2002), AR (Rubio et al., 2003) y FRI (Gianaroli et al., 1997).

Estudios recientes prospectivos randomizados en cuanto al grupo de EMA, existen dos. El primero de ellos publicado por Werlin y colaboradores en 2003 comparan los resultados obtenidos en 7 pacientes con EMA a las que se les realiza PGS con un grupo control de 12 pacientes de EMA sin PGS, y obtiene tres embarazos en ambos grupos. En 2004 este mismo grupo presentó 6 embarazos (40%) en un total de 15 pacientes con EMA a las que se les realiza PGS frente a 3 de 13 del grupo control (23%). El otro estudio publicado por Staessen y colaboradores en 2004, comprende una muestra de 400 pacientes de EMA que fueron randomizadas con y sin PGS, donde se observa un número elevado de embriones aneuploides en el grupo del PGS (60%) con una media de 2 embriones transferidos frente a 2,8 en el grupo control, donde se obtiene una tasa de implantación y de embarazo evolutivo a las 12 semanas muy similares y no significativas frente al grupo control (17,1% *versus* 11,5%; 16,5% *versus* 10,4%).

El PGS en aborto recurrente (AR) aunque algunos centros han reportado las tasas de éxito con esta técnica hay muy poco publicado en este área y los datos muestran que el 30 al 60% de los embriones en estas pacientes son aneuploides, y que hay una cierta incidencia de cromosomas implicados en la aneuploidía como el 16 y el 22 que podrían dar una guía para el uso de la FISH en un futuro. El hecho de que el 70% de estas pacientes puedan conseguir un embarazo evolutivo sin ningún tipo de intervención, hace que los clínicos reclamen más evaluaciones antes de utilizar el PGS como tratamiento de estas parejas.

En el grupo de fallo recurrente de implantación (FRI), en un estudio prospectivo de Gianaroli y colaboradores en 1999, donde incluye 54 pacientes con historia de tres o más fallos de FIV, la mitad realizaron PGS y la otra mitad no, aunque no fue randomizado, los grupos mantenían características comparables, en cada grupo se obtuvo 5 embarazos y las tasa de implantación no fueron significati-

vas (17,3% *versus* 9,5% en el grupo control). Estas pacientes presentaron un 54% de embriones aneuploides. En pacientes con FRI, se ha demostrado que la FISH sólo detecta el 69% de las anomalías cromosómicas que la hibridación genómica comparativa (CGH) puede detectar en estos embriones (Wilton et al., 2001).

La idea de que la transferencia preferencial de embriones cromosómicamente normales mejora los resultados de FIV parece estar todavía por demostrar. Sin embargo el PGS podría mejorar las tasas de embarazo en un futuro no muy lejano si el análisis del complemento cromosómico del embrión fuera completo.

### Bibliografía

Baart EB, Martini E, Van Opstal D: Screening for aneuploidies of ten different chromosomes in two rounds of FISH: a short and reliable protocols. *Prenat Diagn* 2004; 24:955-61.

Bartels I, Hansmann I, Eiben B: Excess of females in chromosomally normal spontaneous abortuses. *Am J Med Genet* 1990; 35:297-8.

Brown JM, Evans JW. Fluorescence in situ hybridization: an improved method of quantitating chromosome damage and repair. *BRJ* 1992; suppl 24:61-4.

Cohen J, Wells D y Munné S: Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. *Fertil Steril* 2007;87:496-503.

Chatzimeletiou K, Picton HM, Handyside AH: Use of a non-contact, infrared laser for zona drilling of mouse embryos: assessment of immediate effects on blastomere viability. *Reprod Biomed Online* 2001; 2:178-87.

Delhanty J, Griffin D, Handyside A, y cols. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Hum Mol Genet* 1993; 2:1183-5.

Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ.: Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 1982; 38:447-53.

Edwards, RG, Gardner RL. Sexing of five rabbit blastocysts. *Nature* 1968; 214:576-7.

Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1997; 68:1128-31.

Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72:837-44.

Griffin DK, Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Delhanty JDA. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod*; 1991:101-5.

- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 244:768-70.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5:708-14.
- Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod BioMed online* 2000; 1:17-26.
- Michiels A, Van Assche E, Liebaers I, Van Steirteghem, Staessen G. The analysis of one or two blastomeres for PGD using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2006; 21:2396-2402.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8:2185-91.
- Munné S, Magli C, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert. J, Gianaroli L. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998; 18:1459-66.
- Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, Tucker M, Márquez C, Sable D, Ferraretti AP, Massey JB. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999; 14:2191-9.
- Munné S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* 2002, 78:234-36.
- Pellestor F, Girardier A, Andreo B, Amal F Humeau C. Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:141-46.
- Planchot M. Genetic analysis of the oocyte—a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl B:S66-9.
- Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod*. 2003 Jan;18(1):182-8.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. y cols.. "Enzymatic amplification of Beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science*; (1985); 230: 1350-1354.
- Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, De Die C. ESHRE PGD Consortium data collection IV:May-December 2001.
- Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a Molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002; 8:11-20.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Toumaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. 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.

Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M, Bozorgi N, White M, Caffarelli M, Verlinsky Y. Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9:458-61.

Veiga A, Griffin A, Santaló J, Vidal F, Calderón G, Giménez C, Boada M, Egozcue J, Barri PN. Case report: Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Hum Reprod* 1994; 9:2156-59.

Verlinsky Y, Cieslak J, Evsikov S. "Techniques for micromanipulation and biopsy of human gametes and preembryos". In: Verlinsky. Y., Kuliev. A., (eds). *Preimplantation Genetics*. Plenum Press, N.Y. 1991; pp 273-278.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Schooleraft W, Strom C, Kuliev A. "Preimplantation Diagnosis for Fanconi Anemia Combined with HLA matching". *JAMA* 2001; 285: 3130-3.

Verlinsky Y, Cohen J. Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril* 2004; 82:292-4.

Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marelllo E, Hill D, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2003; 80:467-8.

Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of healthy infant after preimplantation confirmation of euploid by comparative genomic hybridisation. *New Engl J Med* 2001; 345:1537-41.

Zenzes MT, Casper RF. Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. *Hum Genet* 1992; 88:367-75.



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

**NUESTRA EXPERIENCIA EN DGP: 10.050 CICLOS (DIC 2006)**

**REALIZAMOS**  
Test de aneuploidías, reorganizaciones cromosómicas y  
enfermedades monogénicas

**OFRECEMOS**  
Programación inmediata - Alta experiencia - Continua innovación tecnológica

## GESTIÓN DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE DGP

Xavier Vendrell

Sistemas Genómicos S.L, Unidad de Genética Reproductiva. Paterna, Valencia.

Correo electrónico: [javier.vendrell@sistemasgenomicos.com](mailto:javier.vendrell@sistemasgenomicos.com)

### Introducción

Intentar resolver problemas de infertilidad y evitar la transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia son los principios básicos del Diagnóstico Genético Preimplantación (DGP). En la actualidad, la oferta del DGP por parte de los centros de Fecundación *in vitro* (FIV) es una realidad generalizada en nuestro país. La mayoría de los centros de FIV optan por derivar los estudios genéticos a un laboratorio externo. El laboratorio de DGP externo debe ser un servicio altamente especializado que requiere un abordaje multidisciplinar donde intervienen enfermeras, embriólogos clínicos, genetistas clínicos, genetistas moleculares y citogenetistas. La interacción de este grupo con los expertos en Reproducción Asistida es imprescindible para ofrecer a las parejas y a las familias, la mejor opción reproductiva en cada momento. Así ha sido puesto de manifiesto en diferentes informes (Geraedts, 2006; Kääriäinen, 2006; Soini et al., 2006).

Actualmente no existe ningún estándar de calidad que se pueda aplicar de forma directa, ni aproximada, a un servicio con las características especiales del DGP. La forma de valorar la calidad de un programa de DGP difiere significativamente de los parámetros propuestos en los programas de FIV, como puede ser la tasa de embarazo, la tasa de aborto o la tasa de implantación (Alper et al., 2002; Mayer et al., 2003). En los últimos años se han propuesto una serie de directrices con el objeto de intentar estandarizar y conseguir los máximos niveles de optimización, reproducibilidad y control de los riesgos que requiere el diagnóstico genético en células únicas (*The Practice Committee of American Society of Reproduction Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology*, 2004; *The Preimplantation Genetic Diagnosis International Society*, 2004; Thornhill et al., 2004).

El principal objetivo de la implantación de un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) es evaluar la efectividad de los procedimientos, identificar y corregir errores, asegurar la sensibilidad y la precisión de los diferentes procesos y supervisar la competencia de los profesionales que trabajan en los diferentes laboratorios. El objetivo del presente trabajo es describir la implantación, por primera vez en España, de un SGC en un programa de DGP externo basado en la norma UNE ISO 9001:2000.

### ¿Por qué implantar un SGC en un programa de DGP?

La necesidad de contar con un SGC es una demanda por parte de los clientes que solicitan estos servicios de diagnóstico. Los resultados presentados por la comisión europea en relación con el DGP y la calidad (Corveleyn et al, 2007), en colaboración con EuroGentest, ESHRE, IPTS y EPALAN, demuestra que el 98% de los centros consultados consideran importante o muy importante contar con un SGC en DGP. No obstante, únicamente un tercio cuentan con algún SGC o están en proceso de implantación.

La implantación de un SGC en general, y en un programa de DGP en particular, está encaminado a la consecución de unos objetivos generales basados en la mejora continua. Los pilares fundamenta-

les para la implantación del programa de gestión de la calidad en DGP han sido los mismos que para la aplicación a otras áreas:

Satisfacer la demanda de los clientes de contar con unos servicios de diagnóstico garantizados  
Mantener un proceso diagnóstico complejo bajo control La mejora continua de nuestro proceso.

En el ámbito sanitario existen una serie de objetivos particulares referidos de forma explícita al grado de satisfacción del paciente como beneficiario último del proceso (Pastor et al., 2006). Por lo tanto, además de los criterios expuestos hemos de tener en cuenta ofrecer al paciente la mejor opción diagnóstica y la mayor, y mejor, información relativa al proceso de DGP.

### ¿Cómo definir la calidad en un programa de DGP?

Actualmente no existe una información clara y completa en relación con la práctica del DGP en Europa. La información más exhaustiva es la que recogen los registros de la ESHRE basados en las diferentes aplicaciones y los resultados, en relación con las indicaciones clínicas. No obstante, no se dispone de información relativa a los sistemas control de la calidad en los programas de DGP, y no existen programas de control de calidad externos orientados de forma específica al DGP.

Desde el punto de vista de la regulación, no existe una legislación europea común. Cada país regula estas prácticas de una forma más o menos específica y, en algunos casos no existe regulación expresa. Además, las grandes diferencias existentes ha generado un flujo importante de pacientes entre los diferentes países (Corveleyn et al, 2007).

En este escenario, resulta muy complejo determinar cuales son las acciones necesarias para asegurar la calidad en los procesos de DGP. No obstante, como hemos dicho, algunas sociedades científicas han publicado unas directrices que pueden orientar en la práctica diaria. En algunos casos no pasan de un mero manual de buenas prácticas de laboratorio y, en otros, pueden servir de base a la hora de implantar un SGC.

En nuestra opinión, un servicio de DGP basado en la calidad se debería basar en un programa con alta capacidad diagnóstica, con la máxima optimización y reproducibilidad de los ensayos y con un sistema de control basado en la validación antes del proceso diagnóstico en células embrionarias, ya que la principal limitación de los ensayos de DGP es la imposibilidad de repetición de los estudios. Además, todo este esquema debería estar avalado por controles de calidad externos.

### ¿Qué es la certificación?

En general, en todos los laboratorios se trabaja en base a unos criterios de buena práctica de laboratorio. En ocasiones existe un manual escrito de los protocolos o procedimientos que se llevan a cabo y en otras no. No obstante, la certificación incorpora un elemento diferenciador y es la verificación, por parte de una entidad reconocida como independiente, del cumplimiento de una serie de requisitos definidos en normas o especificaciones técnicas.

En nuestro caso la entidad certificadora ha sido AENOR, que concede una marca de conformidad con normas. Con la obtención del sello de calidad se da a entender que el sistema de gestión de la calidad de nuestro laboratorio ha sido objeto de las auditorías y controles establecidos en el sistema de certificación y que AENOR ha obtenido la adecuada confianza en su conformidad con la Norma UNE-EN ISO 9001. Adicionalmente AENOR entrega junto con el certificado de Registro de Empresa, el certificado IQNet que facilita el reconocimiento internacional del certificado de AENOR.

### ¿Cómo se implanta un SGC en un servicio de DGP?

En primer lugar es necesario aclarar que nuestro programa de DGP es un programa de DGP externo. Esto significa que parte de los procedimientos implicados en el esquema de trabajo ocurren fuera de nuestros laboratorios y bajo la supervisión y control de profesionales ajenos a nuestro servicio.

El primer paso hacia la certificación es la voluntad de la Dirección de la organización de contar con un servicio certificado. Esto requiere, en muchos casos, la inversión en recursos humanos y materiales necesarios. En nuestro caso la certificación se preparó desde el inicio del servicio. En este contexto las etapas fueron:

Evaluación de las necesidades

Identificación de los procesos

Documentación de los procesos

Establecimiento de los parámetros de control Auditorías internas

Control de las desviaciones

#### **Evaluación de las necesidades**

La evaluación de las necesidades es un paso crítico en la implantación de un SGC en un laboratorio. Las necesidades son tanto de personal como de equipos y materiales necesarios.

#### **Las necesidades de personal.**

Se basan en el establecimiento de un organigrama en el que figuran los puestos de las personas responsables de los diferentes procesos. Cada puesto queda situado de una forma organizada y jerárquica de forma que quede claro quien reporta a quien y cual es el grado de formación y capacitación necesarias para desempeñar el puesto. Toda la información queda reflejada en un documento de ficha de puesto.

#### **Las necesidades técnicas.**

La evaluación de las necesidades técnicas permite prever la preparación de diferentes equipos y espacios implicados en los diferentes procesos. Para ello, siguiendo recomendaciones internacionales y requisitos generales de la norma ISO/IEC 17025:2005, se ha realizado la separación física de áreas críticas, consiguiendo la creación de laboratorios especiales para cada proceso: codificación de muestras, extracción de DNA, manipulación celular, pre-PCR, PCR, post-PCR secuenciación, FISH.

#### **Identificación de los procesos**

El SGC basado en la norma ISO 9001:2000 es un sistema de gestión basado en procesos. Existen tres tipos diferentes de procesos: Procesos estratégicos, procesos clave y procesos soporte.

Nos centraremos en la descripción de los procesos clave. Los procesos estratégicos dependen íntegramente de la Dirección y van más encaminados a la toma de decisiones estratégicas, como puede ser la oportunidad comercial, la interacción con los clientes, etc. Los procesos de soporte ayudan al cumplimiento de la norma de forma paralela u horizontal a los procesos clave como son la política de compras, evaluación de proveedores, gestión de recursos humanos, control de equipos y red comercial.



En cuanto a los procesos clave son aquellos que tienen lugar desde que entra la muestra hasta que se emite el informe de resultados. El primer paso es elaborar un diagrama de flujo que nos permitirá localizar de forma secuencial los diferentes procedimientos, interrelacionarlos y establecer los puntos de control necesarios (Figuras 1 y 2).



Figura 1. Diagrama de flujo del procedimiento de DGP-FISH

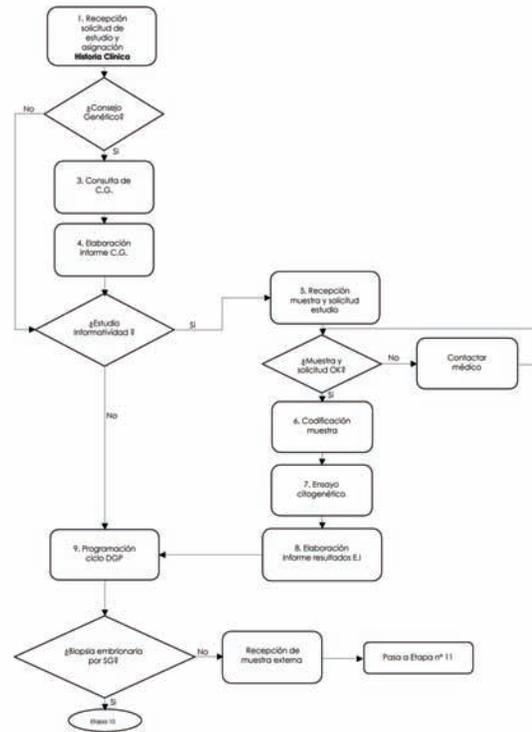
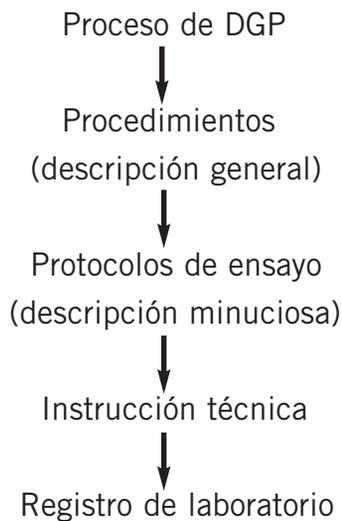


Figura 2. Diagrama de flujo del procedimiento de DGP-molecular

### Documentación de los procesos

Los procedimientos que aparecen en el diagrama de flujo tienen que ir descritos en el manual de calidad. La elaboración de este manual es una de las partes más arduas de todo el proceso de certificación. Desde el punto de vista de la documentación establecemos una estructura documental que nos sirva en nuestro proceso. En nuestro caso:



### Establecimiento de los parámetros de control

En esta parte es muy importante tener claro qué requisitos exige la norma y qué requisitos técnicos introducimos nosotros en base a nuestros conocimientos, directrices o recomendaciones técnicas. En este sentido, nos hemos basado en parte en las directrices publicadas por el *PGD Consortium* de la ESHRE (Thornhill et al., 2004). En este punto tenemos que tener muy claro: ¿Qué queremos medir y registrar? ¿Dónde se guardan los registros? ¿Qué sistema de medición vamos a utilizar? y ¿Quién cumple los registros?

Es muy importante destacar que un programa de DGP externo requiere la implicación de la unidad de Genética clínica, la Unidad de FIV y los laboratorios de análisis. Resulta imprescindible la existencia de una comunicación fluida y continuada entre estos tres elementos y deben actuar bajo un estricto control de calidad.

A continuación, exponemos de forma esquemática los parámetros mínimos de control en los diferentes procesos:

### Consideraciones generales.

Existen una serie de procesos de soporte que tienen lugar de manera continua y organizada. Estos procesos son: el control de equipos, control de reactivos, control de accesos a las diferentes estancias, control de limpieza, control de compras, control de proveedores, control y evaluación del personal que realiza cada función, etc. Todos estos procesos están descritos en el procedimiento general y en instrucciones técnicas específicas.

Solicitud de DGP. Antes de iniciar el caso de DGP cumplimos una serie de consideraciones:

- Revisar la indicación clínica del caso junto con la clínica solicitante
- Recopilar información genética del caso
- Realizar estudios genéticos de diagnóstico (si procede)
- Ofrecer una información completa a la pareja/familia o clínica solicitante
- Ofrecer un consejo genético reproductivo
- Asegurarse de la firma del consentimiento informado específico para la indicación en concreto
- Asegurarse de la firma de la solicitud de estudio específico.

DGP-FISH. Los controles de calidad se centran fundamentalmente en las sondas de ADN y el procedimiento de FISH:

*Sondas de ADN:*

- Criterios claros de interpretación de las señales de hibridación: intensidad, especificidad y ruido de fondo
- Control de todas las sondas que se adquieren antes de su primer uso (% hibridación, especificidad)
- Validación de ensayos en linfocitos de portadores de anomalías estructurales: especificidad, hibridación cruzada, visualización de puntos de corte.

**Procedimiento de FISH:**

- Calibración y control de temperaturas y tiempos de hibridación y lavados
- Control de tiempos de caducidad de reactivos, sondas, soluciones en *stock*, soluciones en uso
- Uso de contratinción adecuada
- Control de equipos (hibridadores automáticos, microscopios, *software*).
- Uso de filtros individuales para cada fluoróforo y valoración individual de las señales
- Dos observadores independientes
- Conservación de las muestras después de los estudios DGP-PCR.

**Especificaciones generales especiales:**

- Todas las soluciones utilizadas deben tener la especificación “para uso en biología molecular”
- Esterilización por UV de las soluciones y *mixes* de las PCRs
- Preparación de reactivos en alícuotas estériles de un solo uso
- Utilizar fungible libre de DNA y DNAsas
- Testar los oligonucleótidos y comprobar que están libres de DNA humano contaminante
- Uso de indumentaria adecuada (guantes de cirugía sin talco y doble guante, cubre-cabezas, mascarilla).

## Separación física de espacios:

- laboratorios de pre-PCR, PCR y post-PCR
- Equipos de uso exclusivo para DGP: cabinas de flujo laminar específicas para cada paso, pipetas automáticas, termocicladores, centrífugas, neveras, congeladores, etc.
- Interpretación de los resultados por dos personas capacitadas e independientes.

## Validación de ensayo:

- Realizar estudios de validación en todos los casos con células únicas: identificación y control de ADO, valoración de la eficacia de amplificación.

## Controles de la PCR:

- Uso, en todos los casos, de marcadores microsatélites informativos además del locus o la mutación concreta
- Uso de controles positivos y negativos
- Uso de un blanco lavado por cada blastómero
- Adición de ADN de los manipuladores que intervienen en el proceso.

Informes de resultados.

La elaboración de informes de resultados es uno de los aspectos en los que hemos centrado nuestro máximo interés. Nuestro modelo se basa en las directrices publicadas por la *European Molecular Genetics Quality Network* (EMQN) (Payne 2001) y la *Swiss Society of Medical Genetics (Best Practice guidelines on reporting in molecular genetic diagnosis laboratories in Switzerland, www.ssgm.ch)*. Las principales características se basan en que el informe deber ser claro, conciso, preciso, inequívoco y fácil de interpretar.

### Seguimiento.

Es muy importante realizar un seguimiento de los casos después de la transferencia embrionaria con el objeto de registrar una serie de variables que nos van a servir para controlar los indicadores de calidad del proceso. El seguimiento postransfer también nos permite la realización y el registro del diagnóstico genético prenatal en caso de embarazo.

### Participación en rondas interlaboratorio.

Es muy importante poder comparar nuestros procedimientos con estándares de calidad de una organización externa, cualificada y reconocida. La participación en rondas voluntarias interlaboratorio nos da una medida de nuestro nivel de calidad y nos permite cumplir con uno de los principios de la norma que es la mejora continua.

Actualmente existe una limitación en este sentido en el campo del DGP ya que no existe ninguna ronda de control de calidad externa interlaboratorio especialmente dirigida al DGP. No obstante, desde el punto de vista molecular, participamos en todos los esquemas de la EMQN. Esto nos ayuda a:

Mantener un estándar elevado en el diagnóstico genético molecular

Introducir mejoras en el diseño de informes de resultados

Mejorar en el manejo de casos complejos

Tener acceso de directrices y documentos de buenas practicas en diagnóstico molecular e implantar mejoras en nuestros procedimientos

Mantener contacto con otros laboratorios y grupos de expertos para actualizar conocimientos.

### Auditorias internas

La realización de auditorias internas es un requisito de la norma. La auditoría interna tiene como finalidad comprobar la implantación del SGC. Se llevan a cado por la Directora de Calidad y participa el Responsable del departamento. La frecuencia de realización es anual y La Directora de Calidad da los programas con antelación suficiente comunicando a las personas implicadas cual es el objeto y el alcance de la auditoría. Al finalizar, la auditora realiza un informe de auditoría al que se adjunta los Informes de Acciones Correctivas derivadas de la auditoria. El auditor comenta el informe con el auditado y éste firma el informe de auditoria y las acciones correctivas. El informe se distribuye al auditado, Directora de Calidad y Dirección.

### Control de desviaciones

Si se detecta algún tipo de discrepancia entre los requisitos que marca la norma y los diferentes procesos se imponen determinadas acciones encaminadas a corregir estos posibles desajustes. Una vez comprobado que han sido subsanados se procede a la documentación de los cambios y a la auditoria externa.

### **Conclusiones**

El DGP está experimentando un proceso de consolidación como una forma precoz de diagnóstico genético. Actualmente la regulación tanto a nivel legislativo como de gestión de la calidad está todavía en sus principios. En estos momentos estamos asistiendo a la creación de los primeros grupos de trabajo y redes específicas dirigidas a la gestión y control de calidad de los estudios genéticos. La implantación de un sistema de gestión de la calidad en un laboratorio de DGP en este contexto resulta de extrema utilidad a la hora de intentar estandarizar, validar y controlar procesos tan complejos como los que están implicados en el DGP.

## ENSAYO PILOTO DE UN PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO PARA FISH EN ESPERMATOZOIDES

Juan Pablo Ramírez

CEIFER (Centro de Estudio e Investigación de la Fertilidad). Granada. Correo electrónico: [info@ceifer.com](mailto:info@ceifer.com)

### Introducción

En los últimos años ha irrumpido con fuerza dentro del Laboratorio la “Asignatura de la Calidad”. Términos como Sistemas de Calidad, Controles de Calidad, Indicadores de Calidad han pasado de ser desconocidos y temidos a ser del todo cotidianos en nuestro trabajo diario.

La forma más coherente de centrar todos nuestros esfuerzos en el campo de la Calidad es a través de los llamados “Sistemas de Calidad”, que van a presidir y enmarcar todo nuestro sistema de trabajo. Estos Sistemas de Calidad están comenzando a ser ya en muchos casos de carácter obligatorio. Así, el reciente Real Decreto 1301/2006 que establece las normas de calidad y seguridad en donación de células, dice en el Artículo 16: “Los establecimientos de tejidos deberán desarrollar y mantener actualizado un sistema de calidad y de gestión de calidad integrado en las directrices y estrategias del establecimiento de tejidos”.

Dentro de los Sistemas de Calidad, el estándar internacional para el laboratorio es la ISO 15189. En el punto 5.6.4 dice “los laboratorio deben participar en comparaciones interlaboratorios, como las organizadas por Controles de Calidad externos. Los laboratorios deben analizar sus resultados y tomar las medidas correctivas cuando no sean los adecuados”.

Incluso aquellos Centros o Laboratorios no acreditados por esta exigente norma y si por la más general ISO 9001:2000 deben de controlar todos los procesos que realizan y participar en Controles de Calidad externos en caso de que existan.

En el ámbito del laboratorio de reproducción a nivel nacional existen dos programas de Control de Calidad Externo. EL primero corresponde al Control de Calidad Externo de Análisis de Semen, que empezó su andadura en 1998, participando actualmente más de 150 laboratorios. Consiste en el envío de suspensiones de espermatozoides (para medida de concentración espermática), DVD con imágenes para evaluar movilidad y portas con extensiones de espermatozoides fijados para evaluación de morfología y vitalidad espermática (Álvarez et al., 2005; Castilla et al., 2005). El segundo programa, destinado al laboratorio de FIV (Control de Calidad Externo del Laboratorio de Reproducción), cuenta con la participación de unos 30 laboratorios, y consiste en el envío de material para evaluar su embriotoxicidad, y de DVD con imágenes de embriones (Castilla, 2003).

Por otra parte la Guía de Buenas Prácticas de Diagnóstico Genético Preimplantacional de la ESHRE, recomienda en su apartado V la participación tanto en Controles de Calidad internos como Externos. Además si no existieran, recomienda su creación.

Por todo esto, nos propusimos desarrollar e implantar un programa de Control de Calidad Externo de FISH en espermatozoides y tal como hicimos en los dos casos anteriores hemos procedido a la realización de una experiencia piloto, que nos puede permitir evaluar la viabilidad de este proyecto.

### Material y Métodos

En el ensayo piloto consistió en la evaluación mediante FISH de dos muestras de semen congeladas (2 pajuelas 0,5 mL). Las muestras de semen procedían de candidatos a donantes de semen con un *screening* negativo para enfermedades infecciosas transmisibles (VIH, Lues, Hepatitis B y C) Las muestras se mandaron a los centros participantes en contenedores específicos, para transporte en nitrógeno líquido (Voyageur 2, Air liquide).

La difusión del ensayo piloto se realizó de la siguiente manera. En primer lugar se presentó en la Jornada previa al III congreso de ASEBIR en Zaragoza (1995) en el marco de la Reunión del grupo de trabajo de DGP de ASEBIR. A continuación se realizó un mailing a todos los socios de ASEBIR invitando a estos a participar de forma gratuita.

Se recomendaba realizara cada muestra una FISH triple (cromosomas X, Y y 18) y una FISH dual (cromosomas 13 y 21).

### Resultados

#### **TABLAS**

Tabla I. Muestra 1- FISH triple

<b>Genotipo</b>	<b>Centro 1</b>	<b>Centro 2</b>	<b>Centro 3</b>
Haploide X	49,04 %	48,83 %	48.72 %
Haploide Y	50,32 %	50,05 %	51.12 %
Hiperploidia XY	0,23 %	0,19 %	0,00 %
Disomia XX	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Disomia YY	0,18 %	0,19 %	0,00 %
Disomia 18	0,05 %	0,00 %	0,00 %
Diploide 46, XY	0,09 %	0,28 %	0,00 %
Diploide 46, XX	0,09 %	0,09 %	0,00 %
Diploide 46, YY	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Nulisomias sexuales	No evaluado	0,28 %	0.16 %
Nulisomia 18	No evaluado	0,09 %	0,00 %
Otras	0,00 %	0,00 %	No evaluado

Tabla II. Muestra 1- FISH dual

Genotipo	Centro 1	Centro 2	Centro 3
Haploide	99,41 %	99,01 %	99,85 %
Disomía 13	0,10 %	0,10 %	0,10 %
Disomía 21	0,10 %	0,30 %	0,05 %
Nulisomia 13	No evaluado	0,10 %	0,00 %
Nulisomia 21	No evaluado	0,10 %	0,00 %
Diploide	0,39 %	0,40 %	0,00 %
Otras	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Tabla III. Muestra 2- FISH triple

Genotipo	Centro 1	Centro 2	Centro 3
Haploide X	50,66 %	51,83 %	72,23 %
Haploide Y	48,81 %	47,71 %	27,67 %
Hiperploidía XY	0,24 %	0,09 %	0,00 %
Disomía XX	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Disomía YY	0,19 %	0,00 %	0,00 %
Disomía 18	0,00 %	0,00 %	0,10 %
Diploide 46, XY	0,10 %	0,27 %	0,00 %
Diploide 46, XX	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Diploide 46, YY	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Nulisomias sexuales	No evaluado	0,09 %	0,00 %
Nulisomia 18	No evaluado	0,00 %	0,00 %
Otras	0,00 %	0,00 %	No evaluado

Tabla IV. Muestra 2- FISH dual

Genotipo	Centro 1	Centro 2	Centro 3
Haploide	99,85 %	99,12 %	99,85 %
Disomía 13	0,00 %	0,00 %	0,10 %
Disomía 21	0,10 %	0,19 %	0,05 %
Nulisomia 13	No evaluado	0,29 %	0,00 %
Nulisomia 21	No evaluado	0,19 %	0,00 %
Diploide	0,05 %	0,19 %	0,00 %
Otras	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Como resultado del *mailing*, se mostraron interesados en participar un total de 14 Centros. Posteriormente fueron sólo 6 Centros los que decidieron continuar en el estudio. A estos Centros, se les envió las muestras, habiendo recibido por ahora (julio 2007) resultados de 3 Centros.

Los datos figuran en las Tablas I, II, III y IV.

### Discusión

Debido al número de resultados recibidos por ahora es muy difícil realizar su comparación basándonos en un análisis estadístico de los datos. Si podemos describir que existe bastante similitud en los resultados de los Centros 1 y 2 y una mayor discrepancia en los del Centro 3.

Por otra parte es evidente que el interés despertado en un principio por nuestra experiencia piloto no se ha concretado posteriormente, por lo que por el momento vemos inviable el establecimiento de un Programa de Control de Calidad Externo en FISH.

### Bibliografía

Álvarez C, Castilla JA, Ramirez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernández A, Gaforio JJ. External quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22:379-87.

Castilla JA, Morancho-Zaragoza J, Aguilar J, Prats-Giménez R, Gonzalvo MC, Fernandez-Pardo E, Álvarez C, Calafell R and Martinez L. Quality specifications for seminal parameters based on state of the art. *Hum Reprod* 2005; 20:2573-8.

Castilla JA. Resultados de un ensayo piloto para un programa nacional de control de calidad externo de laboratorio de FIV. II Congreso de la Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), Granada 11-12 de Diciembre de 2003

## LA NUEVA LEY DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y SUS IMPLICACIONES PARA EL DGP

Esther Velilla

Instituto Marqués sl, Centro de Medicina Embrionaria sl. Correo electrónico: [Esther.velilla@institutomarques.com](mailto:Esther.velilla@institutomarques.com)

Este artículo pretende realizar un análisis del apartado que regula el Diagnóstico Genético Preimplantacional de la nueva ley de reproducción asistida (Ley 14/2006, de 26 de Mayo).

A modo introductorio, el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) es una técnica de análisis de los embriones antes de su implantación en el útero materno que permite descartar aquellos embriones portadores de alguna anomalía genética o cromosómica. Se empezó a desarrollar en los años 90 y se aplicó en sus inicios para seleccionar embriones afectados de enfermedades hereditarias ligadas al sexo. A finales de los 90 esta tecnología ha sufrido una creciente aplicación en centros de reproducción asistida. El DGPI se aplica básicamente en dos poblaciones diferenciadas: la población que consulta en centros de esterilidad y las parejas portadoras de enfermedades hereditarias.

Para la realización de un DGPI es necesario realizar la extracción de un blastómero en los embriones en día tres de desarrollo para su posterior análisis genético o estudio cromosómico. El embrión es mantenido en condiciones de cultivo *in vitro* hasta la obtención del resultado del DGP, entre 12 y 24h dependiendo del tipo de análisis genético que se requiera.

El artículo 12 de la nueva ley empieza diciendo que “*Los centros debidamente autorizados podrán practicar técnicas de diagnóstico genético preimplantacional*”. La autorización sanitaria de los centros está regulada en el Capítulo V.

La ley especifica en qué casos se puede realizar un diagnóstico genético preimplantacional para:

*La detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptible a tratamiento curativo postnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los preembriones no efectos para su transferencia.*

Bajo este apartado se contempla la detección de embriones portadores de alguna enfermedad monogénica de aparición precoz. La ley anterior (Ley 35/1988) no realizaba esta diferenciación entre enfermedades de aparición precoz y tardía sino que estaban contempladas de una misma forma. La ley actual simplemente intenta regular el DGP para enfermedades hereditarias de aparición tardía, no limitando su aplicación sino controlándola ya que precisa de previa autorización por parte de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA) tal y como se regula en el apartado 2.

*A) la detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión.*

Bajo este apartado, está incluido el DGP para la detección de anomalías cromosómicas. Estos estudios se basan en la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* fluorescente y se centran en detec-

tar anomalías cromosómicas numéricas o estructurales en los embriones. En los últimos años la aplicación de esta tecnología en el campo de la reproducción humana ha sufrido un incremento importante siendo la técnica de DGP mas indicada. Empezó por aplicarse en paciente portadores de alguna enfermedad hereditaria ligada al sexo y actualmente se está aplicando en pacientes que consultan por esterilidad y/o infertilidad. Es bien conocida la repercusión de una anomalía cromosómica en la viabilidad del embrión y su aplicación es de gran interés en la medicina reproductiva ya que aproximadamente el 90% de los embriones con anomalías cromosómicas se bloquean en algún momento de su desarrollo embrionario; estos embriones pueden no implantarse o cursar como abortos espontáneos. Sólo un pequeño porcentaje de ellos (10%) son compatibles con la vida dando lugar a niños afectados de alguna patología (Síndrome de Down, Síndrome de Turner, Klinefelter, etc). En los centros de reproducción asistida se concentran la mayoría de pacientes con riesgo cromosómico ya que consultan por largos períodos de esterilidad o abortos recurrentes.

Juntamente con este apartado la ley especifica que *“La aplicación de las técnicas de diagnóstico genético preimplantacional en estos casos deberá comunicarse a la autoridad sanitaria correspondiente, que informará de ella a la comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.”*

En este se regula que todos aquellos casos de DGPI realizados en un centro de reproducción asistida independientemente de la técnica utilizada deberán comunicarse a la autoridad sanitaria correspondiente pero no regula el tipo de información (nombre de la pareja, tipo de estudio, indicación médica o no, etc). En Cataluña este apartado queda resuelto a través del registro individualizado de Reproducción Humana Asistida de Cataluña (FIVCAT) dónde se recogen los datos individualizados para cada ciclo de tratamiento con la finalidad de controlar y evaluar la efectividad de las técnicas y proporcionar información epidemiológica de interés.

El segundo apartado del artículo 12 dice que *“La aplicación de las técnicas de diagnóstico genético preimplantacional para cualquier otra finalidad que no comprenda el apartado anterior, o cuando se pretendan practicar en combinación con la detección de los antígenos de histocompatibilidad de los preembriones in vitro con fines terapéuticos para terceros, requerirá de la autorización expresa, caso a caso de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, que deberá evaluar las características clínicas, terapéuticas y sociales de cada caso.”*

La nueva ley pretende establecer un mayor control sobre aquellas enfermedades susceptibles a DGP y no exentas de polémica. Este apartado hace referencia básicamente a las enfermedades genéticas de expresión tardía y/o con cierto grado de penetrancia y a los casos de aplicación del DGP para fines terapéuticos a terceros. En el primero de los casos se trata de enfermedades como puede ser la corea de Huntington con una expresión entorno a los 40 años de edad y sin posible tratamiento curativo o la Neurofibromatosis que es una enfermedad de expresión muy variable y también sin tratamiento curativo que puede presentar desde una sintomatología muy leve que no compromete la vida de la persona que la sufre a una afectación de diferentes órganos. En estos y en la aplicación del DGP con fines terapéuticos la nueva ley da poder a la CNRHA para estudiar, evaluar cada caso para su aprobación pudiéndose adaptar a los avances científicos, a las necesidades sociales actuales y a la realidad del momento. Dejando aparte las consideraciones éticas relacionadas con la razón del embarazo y con los embriones libres de la enfermedad genética que serán descartados por el simple hecho de no presentar los antígenos de histocompatibilidad del hermano, hay unos condicionamientos técnicos que hacen que las probabilidades de éxito sean muy bajas. En el caso donde ambos miembros de la pare-

ja son portadores de una enfermedad genética autosómica recesiva como podría ser la Anemia de Fanconi, se estima que 3 de cada 16 embriones aproximadamente no expresarán la enfermedad (serán no portadores o portadores no afectados) e histocompatibles con un hermano enfermo. En el caso que se requiera DGP para la detección de embriones histocompatibles como por ejemplo en los casos de leucemia, se estima que 1 de cada 4 embriones serán histocompatibles.

A la baja eficiencia se le tiene que añadir que la gran mayoría de parejas que acuden con esta necesidad la mujer presenta una edad reproductivamente avanzada (mayor de 37 años) y por tanto con una menor reserva ovárica y con un riesgo importante de presentar embriones portadores de alguna anomalía cromosómica con lo que esto implica. Técnicamente hoy en día no puede realizarse el estudio genético y cromosómico en una única célula. Además debemos disponer de embriones de buena calidad morfológica para su desarrollo *in vitro* y posterior embarazo.

El artículo 26 de la ley especifica como infracción la selección de sexo. Según encuestas realizadas a diferentes colectivos la selección de sexo para el equilibrio familiar en sociedades desarrolladas podría ser contemplada, pero debemos tener siempre presente que la ley es muy clara y tajante en este apartado considerándola infracción muy grave.

La Legislación Española es una de las legislaciones más liberales de Europa; muchos centros españoles reciben pacientes de otros países en los que está prohibido el diagnóstico genético preimplantacional, por ejemplo Italia, Alemania, Suiza, Austria, etc.

Los avances de la ciencia aplicables a la medicina suponen en general una gran satisfacción para médicos y pacientes. Aunque la legislación siempre va por detrás de los avances de la sociedad, esta nueva ley está elaborada de manera que podrá en un futuro siempre bajo la regulación de la CNRHA avanzar a medida que avanza la ciencia y la sociedad.

# SISTEMA OCTAX™

Rapidez, precisión y seguridad en su laboratorio



#### OCTAX EyeWare™

Captura y almacenamiento de datos. Mediciones. Generación de informes.

#### OCTAX EyeWare™ MX

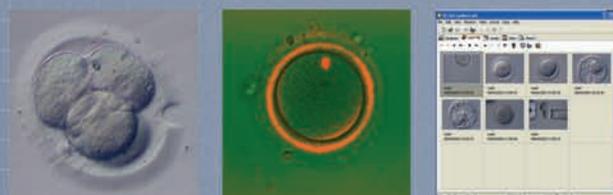
Grabación de vídeos.

#### OCTAX Laser Shot™

Perforación de la zona pelúcida, biopsias, inmovilización de espermatozoides asistida por láser.

#### OCTAX ICSI Guard™

Visualización de la placa metafásica en tiempo real.



# OLYMPUS

Your Vision, Our Future

## SISTEMA OPIOIDE Y FERTILIDAD MASCULINA

Jon Irazusta\*, Ekaitz Agirregoitia y Nerea Subiran

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea. Leioa, Bizkaia. Correo electrónico: [jon.irazusta@ehu.es](mailto:jon.irazusta@ehu.es)

### Introducción

Los péptidos opioides son sustancias endógenas, con características farmacológicas similares a los derivados del opio ó opiáceos (morfina, heroína, codeína, etc), entre las que se encuentran las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas. La acción de los opioides ocurre tras la unión a tres tipos diferentes de receptores de membrana ( $\delta$ ,  $\kappa$  y  $\mu$ ) y la finalización del mensaje de los opioides se produce por la acción de peptidasas que los degradan produciendo fragmentos inactivos (Hersh, 1982; Roques et al., 1993).

Su función mejor conocida es la analgesia interna, pero también tienen un papel relevante, además de en otros sistemas, en la reproducción (Fabri et al., 1989). En este sentido, hace cierto tiempo se sabe que la administración habitual de opiáceos provoca anomalías seminales en los hombres (Ragni et al., 1988) y amenorrea en las mujeres (Santen et al., 1975). Los péptidos opioides tienen un efecto similar inhibiendo la liberación de gonadotropinas tanto en el hipotálamo como en la hipófisis (Kalra et al., 1988). Además los opioides están presentes en diversas estructuras reproductivas tales como las células de Leydig, el epidídimo y la próstata (Gerendai et al., 1991). También en el semen existen concentraciones muy elevadas de algunos péptidos opioides (Davidson et al., 1989; Kew et al., 1990). De hecho, las encefalinas tienen una concentración en el líquido seminal del orden de 10 veces mayor que en el suero sanguíneo (Fusijawa, 1996). Además la actividad de enzimas degradadoras de opioides es mucho mayor que en la mayoría de tejidos y órganos (Fernández et al., 2002).

Estudios funcionales realizados incubando espermatozoides en medios con concentraciones variables de agonistas han demostrado que los opioides producen una alteración de la movilidad espermática, tal como ocurría en adictos a drogas opiáceas. Los resultados han sido contradictorios, ya que se han descrito tanto incrementos como decrementos dependiendo de la concentración y el péptido utilizado (Foresta et al., 1985; Fusijawa et al., 1996). Recientemente, se ha descrito la existencia del receptor  $m$ -opioide en espermatozoides de caballo (Albrizio et al., 2005). Sin embargo, no existen evidencias de receptores opioides en células espermáticas humanas. Por ello, el objetivo de este estudio es la descripción del sistema opioide en semen humano, tanto la expresión y localización de los tres receptores ( $\delta$ ,  $\kappa$  y  $\mu$ ), como de sus principales enzimas degradadoras (aminopeptidasa N y endopeptidasa neutra 24.11). Además con el fin de aclarar el efecto del sistema opioide sobre la movilidad, analizaremos la acción de agonistas y antagonistas opioides e inhibidores de su degradación sobre el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos rápidos (tipo A).

## Material y Métodos

### Obtención de la muestra

El semen humano fue obtenido de donantes sanos mediante masturbación, después de 3 días de abstinencia. Todos los donantes fueron normozoospermicos siguiendo los parámetros de la OMS (1999). Los ensayos tuvieron la aprobación de los Comités de Ética del Hospital de Cruces y de la Universidad del País Vasco. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado mostrando su acuerdo con la utilización de sus muestras para la investigación.

Tras la eyaculación, las muestras se recogieron en recipientes estériles y se dejaron durante 30 minutos a 37°C, para que se licuaran. En cada muestra, se midió el volumen seminal, la concentración de espermatozoides y la motilidad.

Antes del *immunoblot* y la inmunofluorescencia, los espermatozoides fueron aislados mediante un gradiente discontinuo de percoll (40%-80%) seguido de un *swim-up* con el fin de recuperar los espermatozoides móviles, sin contaminación de leucocitos u otras células. Todos los procedimientos se llevaron a cabo utilizando medios no-capacitantes (omitiendo bicarbonato y CO<sub>2</sub>). Para ello, las muestras seminales fueron colocadas en la parte superior de la capa de 40% y centrifugadas a 800g durante 20 minutos. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en tampón fosfato salino y se centrifugaron otra vez durante el mismo tiempo. A los espermatozoides se les dejó “nadar hacia arriba” en medio Tyrode no capacitante (TNC) modificado (Flesch et al., 2000).

### Obtención de las fracciones seminales

Para la obtención de las fracciones seminales, se centrifugó el semen fresco a 600g durante 10 minutos. El sobrenadante, que contenía el fluido seminal y los prostasomas, fue centrifugado a 1000g durante 15 minutos, para eliminar restos celulares y espermatozoides residuales. Se descartaron las pastillas resultantes y el sobrenadante fue centrifugado a 100.000g durante 2 horas. El sobrenadante resultante de este proceso fue re-centrifugado al mismo tiempo y velocidad, obteniéndose el fluido seminal libre de prostasomas del nuevo sobrenadante. Las pastillas de la centrifugación previa fueron lavadas y resuspendidas con tampón tris salino, siendo esta última la fracción prostasomal (Fernández et al., 2002).

### Preparación de las membranas espermáticas

Las membranas de los espermatozoides fueron preparadas por métodos habituales (Luconi et al., 1998), modificando el *buffer* de lisis (tampón fosfato salino (PBS) y 1% Triton-X100 (v/v) y cocktail de inhibidores de proteasas, para la detección de receptores).

### SDS/PAGE e inmunoblot

Las membranas fueron resuspendidas en buffer de lisis y los extractos de proteínas diluidos con un tampón que contiene mercaptoetanol (5% v/v) y hervidos durante 5 minutos. Las proteínas (20-40mg) fueron cargadas en geles de resolución del 10% y separadas por SDS/PAGE unidimensional. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando un sistema de transferencia electroforético. Las membranas fueron tratadas y desarrolladas tal como se describió con anterioridad (Aquila et al., 2004). Las diluciones de los anticuerpos policlonales de conejo utilizados fueron: anti-receptor  $\delta$ -opioide (1:2500), anti-receptor  $\kappa$ -opioide (1:300) y anti-receptor  $\mu$ -opioide (1:2500), anti-aminopeptidasa N (1:500), anti-endopeptidasa neutra 24.11 (1:500). La detección de las bandas de proteínas fue llevada a cabo utilizando un sistema de quimioluminiscencia.

### Inmunofluorescencia

Los espermatozoides, aislados tal como hemos descrito con anterioridad, se resuspendieron en PBS y colocadas en cubreobjetos con poli-L-lisina. Las muestras fueron fijadas con 3% paraformaldehído durante 10 minutos. Después de ser lavadas en tampón fosfato salino, las células fueron bloqueadas durante 30 minutos en PBS/ 10% (v/v) con suero fetal bovino. Para el marcaje por inmunofluorescencia indirecta de los receptores y las peptidasas, las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-receptor  $\delta$ -opioide (1:800), anti-receptor  $\kappa$ -opioide (1:50), anti-receptor  $\mu$ -opioide (1:800), anti-aminopeptidasa N (1:300) y anti-endopeptidasa neutra 24.11 (1:300). Las muestras fueron lavadas en PBS tres veces, incubadas con un anticuerpo secundario de cabra Alexa Fluor 488 durante dos horas en oscuridad, vueltas a lavar tres veces y ensambladas con Fluoromount G. Finalmente los espermatozoides fueron observados por microscopia confocal. En la detección de peptidasas, se realizaron controles negativos incluyendo una fracción de inmonoglobulina de conejo en vez del anticuerpo primario.

### Incubaciones con agonistas y antagonistas opioides

Se incubaron los espermatozoides extraídos tal como describimos con anterioridad en los siguientes medios: medio control, medio únicamente con agonista, medio control con antagonista y medio con agonista + antagonista. Los agonistas utilizados fueron DPDPE para  $\delta$ , U 50488 para  $\kappa$  y morfina para  $\mu$  y los antagonistas naltrindol para  $\delta$ , nor-binaltorfimina para  $\delta$  y naloxona para  $\mu$ .

Las concentraciones finales de cada uno de los elementos eran:

- 0,1 mM, 1 mM y 10 mM de agonista
- 100 mM para el control con antagonista
- Las concentraciones anteriores de agonista y 10 veces más de concentración de antagonista en cada caso

### Incubaciones con inhibidores de las peptidasas

En este caso, se utilizaron muestras seminales frescas. Las muestras se diluyeron a una concen-

tración de  $50-80 \times 10^6$  con medio TNC y se dividieron en alícuotas de 0,5 ml. Una de las alícuotas fue incubada con leuhistina (100 mM), inhibidor específico de la aminopeptidas N o con tirofan (150 mM) inhibidor de la endopeptidasa neutra. La segunda alícuota fue incubada en presencia de los mismo inhibidores, junto al agonista opioide naloxona (10 mM). La tercera se incubó únicamente con antagonista y la última en ausencia de antagonista e inhibidor.

### Análisis de la movilidad

Los ensayos de movilidad fueron realizados con un sistema computerizado de análisis espermático a las 0, 2 y 4 horas después de la adición de inhibidores, agonistas ó antagonistas al medio. Los parámetros y la definición de los espermatozoides analizados fueron los establecidos por el fabricante. Para medir la concentración y la movilidad, las alicuotas de muestras seminales fueron colocadas en una cámara Mackler pre-calentada (37°C). De cada alicuota, se analizó un mínimo de 100 espermatozoides de al menos dos gotas de cada muestra. Se consideraron espermatozoides tipo A a los progresivos rápidos con velocidad  $35 \mu\text{m/s}$ .

## Resultados

### Expresión de receptores y peptidasas de opioides

Tal como se observa en las figuras 1 y 2, los experimentos de inmunoblot demostraron la presencia de los tres tipos de receptores opioides y de la aminopetidasa N en la membrana de los espermatozoides. Los prostasomas contenían las dos peptidasas: endopeptidasa neutra 24.11 y aminopeptidasa N. Esta última se hallaba presente también en el fluido seminal. Las bandas obtenidas para cada tipo de proteína eran muy similares a las obtenidas en los tejidos controles positivos (corteza cerebral y riñón).

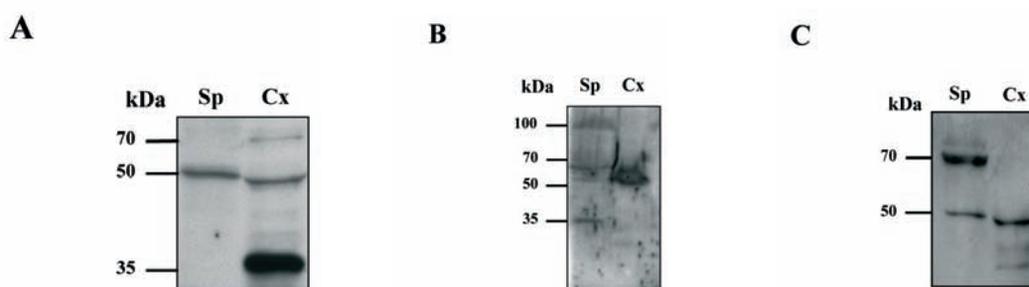


Figura 1. Análisis mediante western blot de los receptores d (A), k (B) y m (C) en membranas de espermatozoides y corteza cerebral humana. El peso molecular se indica a la izquierda.

### Localización de receptores y peptidasas de opioides

Los estudios inmunocitoquímicos revelan que el receptor d-opioide está presente en la membrana plasmática en la parte frontal de la cabeza del espermatozoide (sobre la región acrosomal), en la pieza media y uniformemente distribuido a lo largo del flagelo (Fig. 3A y B). El receptor k-opioide se encontró en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, en la región media y en el flagelo

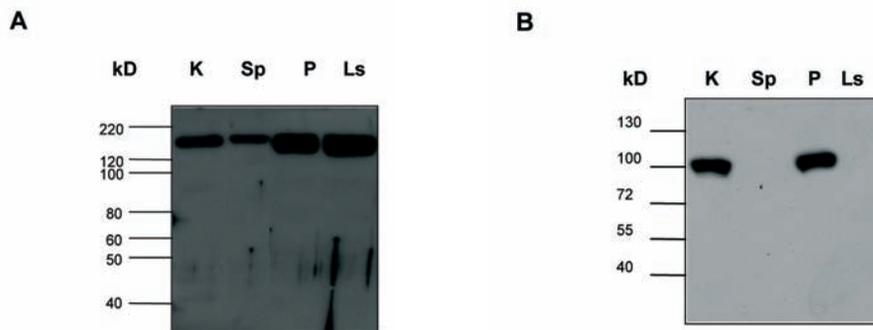


Figura 2. Análisis mediante western blot de la aminopeptidasa N (A) y de la endopeptidasa neutra 24.11 (B) en las fracciones de espermatozoides, prostasomas, fluido seminal y membranas renales humanas. El peso molecular se indica a la izquierda.

(3C y D). Cuando se permeabilizó la membrana plasmática, se encontró un marcaje más intenso en el cuello del espermatozoide. Finalmente el marcaje del receptor m-opioide se observó en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide con más intensidad en la zona ecuatorial/post-acrosómica, en parte de la pieza media y en el flagelo (3E y F). Cuando se omitió el anticuerpo primario no se encontró ningún marcaje (3G y H).

La aminopeptidasa N está presente en la membrana plasmática en la región ecuatorial post-acrosómica de la cabeza, justo encima del cuello y uniformemente a lo largo de la cola (Fig. 4A y E). En aproximadamente el 25% de las células, se encontró marcaje en la parte frontal de la cabeza del espermatozoide. En relación al marcaje de la endopeptidasa neutra (Fig. 4B y F), solo se detectó sobre el cuello en aproximadamente la cuarta parte de los espermatozoides. No encontramos diferencias entre células no permeabilizadas (Fig. 4E y F) y permeabilizadas (Fig. 4A y B). No se encontró unión inespecífica en presencia de suero de conejo pre-inmune (Fig. 4C y G), ni cuando no se añadió anticuerpo primario (Fig. 2D y H).

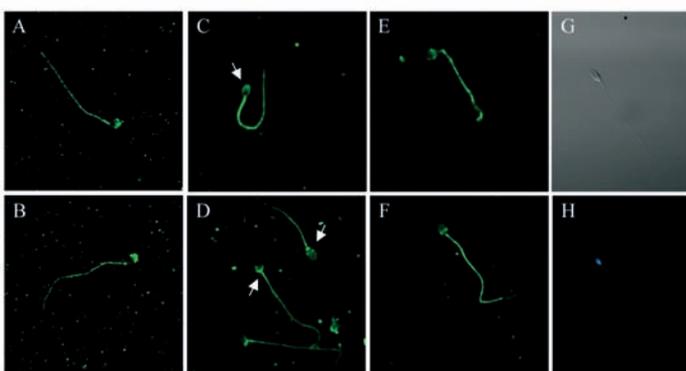


Figura 3. Análisis mediante inmunofluorescencia los receptores  $\delta$  (A y E),  $\kappa$  (B y F) y  $\mu$  (C y G) en espermatozoides humanos en condiciones no permeabilizantes (A, B, C y D) y permeabilizantes (E, F, G, y H). Se realizaron también controles negativos sin anticuerpo primario (D y H). El DNA de los controles se marcó con Hoechst 33342. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

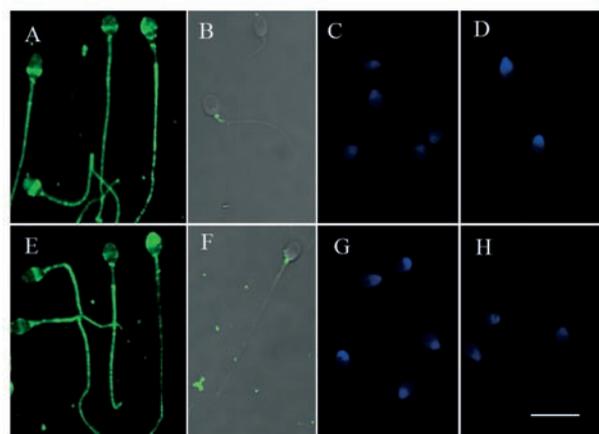


Figura 4. Análisis mediante inmunofluorescencia de la aminopeptidasa N (A y E) and neutral endopeptidase 24.11 (B y F) en espermatozoides humanos en condiciones no permeabilizantes (A, B, C y D) y permeabilizantes (E, F, G, y H). Se realizaron también controles negativos tratados con suero de conejo preinmune (C y G) y sin anticuerpo primario (D y H). El DNA de los controles se marcó con Hoechst 33342. Barra de escala, 10  $\mu$ m.



### Estudios de movilidad

La incubación de los espermatozoides con el agonista d-opioide DPDPE no produce modificaciones en el porcentaje de espermatozoides tipo A. Sin embargo, el nantrindol, antagonista d opioide, produce un descenso de este tipo de espermatozoides de casi un 90% desde su adicción al medio ( $P<0,0005$ ). Al contrario, tanto los agonistas como los antagonistas de receptores k no producen modificaciones significativas en el número de espermatozoides tipo A. El agonista m morfina a una concentración de 0.1 mM provoca un descenso de número de espermatozoides móviles tipo A de un 50% respecto al control ( $P<0,001$ ) a partir de las dos horas de incubación. Esta inhibición es revertida por el antagonista naloxona ( $P<0,001$ ). Concentraciones mayores de morfina no producen modificaciones significativas de la movilidad.

El porcentaje de espermatozoides tipo A decrece un 15% menos tras cuatro horas de incubación, en las muestras seminales incubadas con el inhibidor de la aminopeptidasa N que en muestras control ( $P<0,005$ ). El efecto del inhibidor es completamente revertido por el antagonista opioide naloxona ( $P<0,001$ )

La adicción del inhibidor de la endopeptidasa neutra tiorfan al medio también reducía en un 16% el descenso de espermatozoides móviles tipo A provocado por el tiempo después de 2 horas de incubación ( $P<0,01$ ) y en un 18% tras 4 horas ( $P<0,01$ ). El efecto del tiorfan es revertido por la naloxona a las 4 horas ( $P<0,005$ ). Sin embargo, no se observó una reversión significativa a las 2 horas. La adicción de naloxona sola no alteró la movilidad espermática.

### **Discusión**

En este trabajo, se demuestra por primera vez la existencia de los tres tipos de receptores opioides y de enzimas degradadoras de opioides en semen humano. Estudios de inmunoblot demuestran la presencia de los receptores d-, k- y m- opioides y de la aminopeptidasa N en las membranas del espermatozoide. Además las enzimas degradadoras de péptidos opioides también se encuentran presentes en otros componentes del semen. La aminopeptidasa N también está en los prostasomas y en el líquido seminal. Sin embargo, el anticuerpo contra la endopeptidasa neutra 24.11 sólo obtiene marcaje en prostasomas. En cualquier caso, la presencia predominante de las peptidasas en los prostasomas nos indica que puedan tener algo que ver con la movilidad, ya que estos orgánulos extracelulares tienen una función relevante *in vivo* en el mantenimiento del movimiento de los espermatozoides (Ronquist and Brody, 1985).

El hecho de que, al igual que en cerebro, los diferentes componentes del sistema opioide se encuentren presentes en el espermatozoide apoya la idea de que existe cierta similitud entre los espermatozoides y las neuronas (Meizel, 2004), ya que cada vez se conocen más sistemas de transmisión de señales que se encuentran presentes en ambos tipos celulares (Siems et al., 2003; Macarrone et al., 2004).

Los estudios de inmunocitoquímica nos muestran una distribución heterogénea en el espermatozoide de los tres tipos de receptores, a pesar de que los tres comparten su presencia en el flagelo del espermatozoide. La aminopeptidasa N también se encuentra presente en el cuello y en la región ecuatorial/post acrosomal. En unas pocas células, también se ve inmunomarcaje de este enzima sobre la cabeza del espermatozoide. En lo que respecta a la endopeptidasa neutra, se encuentra únicamente en el cuello de aproximadamente la cuarta parte de los espermatozoides. Esta distribución tan localizada de la NEP puede ser la causa de que el inmunoblot o estudios previos en los que se medía actividad enzimática (Fernandez et al., 2002, Irazusta et al., 2004) no hayan sido capaces de detectarla en espermatozoide.

La función y estructura del espermatozoide se encuentra altamente polarizada por ello las rutas metabólicas y de señalización se compartimentalizan en las regiones donde se necesitan (Aquila et al., 2004; Solakidi et al., 2005). La presencia de tanto receptores como enzimas responsables de su degradación en el flagelo del espermatozoide también nos sugieren una función de los opioides en la movilidad (Turner et al., 2006). Por otro lado, la presencia del receptor m-opioide y de la aminopeptidasa N en la región ecuatorial post-acrosomal parece implicar a este enzima en el proceso de fertilización, ya que este segmento tiene un papel crucial en la fusión entre el espermatozoide y el ovocito (Calamita et al., 2001).

El hecho de que la distribución de cada receptor o enzima no sea igual en todas las células nos indica que éstas pueden estar en diferente estado funcional, ya que en procesos como la capacitación ocurre una reorganización de las proteínas de membrana (Harrison et al., 2005)

Tal como se ha indicado con anterioridad, la alteración de la movilidad es uno de los efectos de los péptidos opioides en el espermatozoide, aunque la acción de estos parece depender de la concentración y del tipo de ligando utilizado. Trabajos recientes, en espermatozoides de caballo, también observan resultados contrapuestos sobre la motilidad dependiendo de la dosis de antagonista opioide utilizada (Albrizio et al., 2005). Nuestro estudio utilizando ligandos más específicos para cada tipo de receptor confirma y aclara en parte los estudios previos sobre el tema, ya que se observan descensos en la movilidad causados por concentraciones bajas de morfina (agonista m) tras cuatro horas de incubación, que son revertidos por el antagonista naloxona. Este hecho está de acuerdo con los efectos causados por la morfina en los adictos (Ragni et al., 1988), y por dosis altas de encefalinas (Sastri et al. 1991), cuyo receptor de preferencia es el d pero que se une al receptor m a concentraciones altas.

Por otra parte, el antagonista del receptor d naltrindol, produce un descenso brusco del número de receptores móviles progresivos nada más añadirse al medio. Esto explicaría los trabajos que indican que una concentración mínima de encefalinas es necesaria para mantener la movilidad (Fusijawa et al. 1996). Los resultados obtenidos con tiorfan y leuhistina, inhibidores de los enzimas degradadores

de encefalinas endopeptidasa neutra y aminopeptidas N respectivamente, también se muestran de acuerdo con esta última hipótesis, ya que su adicción al medio provoca que tras cuatro horas de incubación no se produzca el descenso de movilidad que se produce en los controles. Probablemente porque la inhibición de las peptidasas consigue mantener a las encefalinas en valores adecuados para mantener la movilidad. El efecto opioide de este mantenimiento de la movilidad se demuestra porque es revertido por un antagonista de estos péptidos.

El tiorfan, inhibidor de la endopeptidasa neutra, también modera el descenso de la movilidad tras dos horas de incubación. Sin embargo, al no ser revertido por naloxona, en este caso el efecto no parece opioide. Este efecto puede ser debido a la acción de otros sistemas peptídicos tales como las takininas que provocan incrementos de la movilidad con tiempos más cortos de incubación que los opioides y que pueden ser degradadas también por la endopeptidasa neutra 24.11 (Ravina et al., 2007).

Todos estos resultados nos abren un campo nuevo de investigación tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de la infertilidad masculina. En este aspecto resultaría interesante analizar la relación entre los niveles de los diferentes componentes del sistema opioide (peptidos, receptores y peptidasas) y la capacidad fertilizante de diferentes sémenes en técnicas de reproducción asistida. Por otro lado, sería interesante observar si los péptidos opioides que están implicados en los mecanismos de estrés en SNC e hipófisis (Charmandari et al., 2005), pueden tener alguna relación en el descenso en la calidad de semen que se produce en situaciones de estrés psicológico (Schneid-Kofman and Sheiner, 2005) actuando directamente en el espermatozoide.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por las siguientes instituciones: Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (BFU2006-07779); Diputación Foral de Bizkaia (7/12/EK/2006/61), Gobierno Vasco (SPE06UN29). E. A. y N. S. son beneficiarios de Becas de Investigación de la UPV/EHU.

### Bibliografía

- Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Sciorsci RL, Mari G, Calamita G, *et al.* Expression and subcellular localization of the m-opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reproduction* 2005; 129:39-49.
- Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, *et al.* Estrogen receptor (ER)? and ER? are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1443-51.
- Calamita G, Mazzone A, Cho YS, Valenti G, Svelto M. Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis. *Biol Reprod* 2001; 64:1660-6.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Ann Rev Physiol* 2005; 67:259-284.
- Davidson A, Vermesh M, Paulson RJ, Graczykowski JW, Lobo RA. Presence of immunoreactive beta-endorphin, and calcitonin in human seminal plasma, and their relation to sperm physiology. *Fertil Steril* 1989; 51:878-80.
- Fabbri A, Jannini EA, Gnessi L, Ulisse S, Moretti C, Isidori A. Neuroendocrine control of male reproductive function. The opioid system as a model of control at

- Fernandez D, Valdivia A, Ochoa C, Irazusta J, Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides* 2002; 23:461-8.
- Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469:197-235.
- Foresta C, Caretto A, Indino M, Betterle C, Scandellari C. Localization of met-enkephalin on human spermatozoa and evidence for its physiological role. *Arch Androl* 1986; 17:19-24.
- Foresta C, Tramarin A, Scandellari C, Arslan P. Effects of a Metenkephalin analogue on motility, O<sub>2</sub> consumption, and ATP content of human spermatozoa. *Arch Androl* 1985; 14:247-52.
- Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Silvestroni L, Moretti C, Redi F, et al. Beta-endorphin, Met-enkephalin, and calcitonin in human semen: evidence for a possible role in human sperm motility. *Ann N Y Acad Sci* 1984; 438:365-70.
- Fujisawa M, Kanzaki M, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Metenkephalin in seminal plasma of infertile men. *Int J Urol* 1996;3:297-300.
- Harrison RA, Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 2005 Jan 15; 63 2:342-51.
- Hersh LB. Degradation of enkephalins: the search for an enkephalinase. *Mol Cell Biochem.* 1982; 47:35-42.
- Irazusta J, Valdivia A, Fernandez D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl* 2004; 25:733-9.
- Kew D, Muffly KE, Kilpatrick DL. Proenkephalin products are stored in the sperm acrosome and may function in fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9143-7.
- Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Pecchioli P, Krausz C, Forti G, et al. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:877-85.
- Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabo N, Gasperi V, Pistilli MG et al. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci* 2005; 118:4393-404.
- Meizel S. The sperm, a neuron with a tail: 'neuronal' receptors in mammalian sperm. *Biol Rev Camb Phylos Soc* 2004; 79:713-732.
- Ragni G, De Lauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Gambaro V. Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *Int J Androl.* 1988; 11:93-100.
- Ravina CG, Seda M, Pinto FM, Orea A, Fernandez-Sanchez M, Pintado CO et al. A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod* 2007; 22: 1617-25.
- Ronquist G, Brody I. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta* 1985; 822:203-18.
- Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 1993; 45:87-146.
- Sastray BV, Janson VE, Owens LK. Significance of substance P and enkephalin-peptide system in the male genital tract. *Ann NY Acad Sci* 1991; 632:239-53.
- Siems WE, Maul B, Wiesner B, Becker M, Walther T, Rothe L, et al. Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. *Andrologia* 2003; 35:44-54.
- Schneid-Kofman N, Sheiner E. Does stress effect male infertility?--a debate. *Med Sci Monit* 2005; 11:SR11-3.
- Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER $\alpha$  and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005; 20:3481-7.
- Stein C, ed. Opioids in pain control. Basic and clinical aspects. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(1-2):25-38.
- World Health Organization. 1999 WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th ed. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, Cambridge.

## OOCYTE MORPHOLOGICAL QUALITY. IMPORTANCE FOR DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND THERAPEUTICAL DECISIONS

Rosália Sá,<sup>1</sup> Nieves Cremades,<sup>2</sup> Joaquina Silva,<sup>3</sup> Cristiano Oliveira,<sup>3</sup> Alberto Barros<sup>3,4</sup> and Mário Sousa<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup>Lab Cell Biology, ICBAS, University of Porto, Portugal; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, IVF Unit, Academic Hospital of Alicante, Alicante, Spain; <sup>3</sup>Centre for Reproductive Genetics A.Barros, Porto, Portugal; <sup>4</sup>Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal. Correo electrónico: [msousa@icbas.up.pt](mailto:msousa@icbas.up.pt)

The morphological quality of the human oocyte is an ever present problem during in vitro fertilization (IVF) treatments. It is of surmount importance to separate clinical cases with a few abnormal oocytes from those showing all oocytes attained by an abnormality. Similarly, it is of fundamental importance to separate cases with mixed anomalies from those showing a single type of abnormality. Sometimes they might be related with the type of the protocol used for ovarian controlled hyperstimulation, whereas other times they probably depend exclusively on the genetic capacity of the ovarian reserve.

Abnormal oocyte morphology is currently a strict indication for intracytoplasmic sperm injection (ICSI), abnormal zona pellucida is also an indication for ICSI and assisted hatching (AH), and for cases with all oocytes affected by gross abnormalities or in cases with female chromosomal aberrations, either associated or not with oocyte dysmorphism, preimplantation genetic diagnosis (PGD) should also be performed.

Some of the oocyte abnormalities are immediately found at follicle inspection after ovarian follicle aspiration. These include empty follicles (absence of the oocyte), a fractured zona pellucida (with a nude or destroyed oocyte), degenerated oocytes (dark vacuolated or lysed ooplasm) and immature oocytes, either at prophase I (GV) or metaphase I (MI) of meiosis. For empty follicles and degenerated oocytes we suggest a change in the ovarian stimulation protocol. In the case of degenerated oocytes, we just have one successful birth after 3 attempts in a woman whose large majority of the aspirated follicles rendered degenerated oocytes, independently of the ovarian stimulation protocol. For cases with immature oocytes, at the second IVF attempt the lab should have special media prepared in advance for oocyte in vitro maturation. If this fails, the clinician should proceed for another type of stimulation, directed to the generation and aspiration of small antral follicles at the GV stage.

A correct classification of the morphology of the mature metaphase II (MII) oocyte is crucial for development of research protocols directed to study the impact of abnormal MII oocytes in the IVF outcomes. The following items should be strictly followed by order: zona pellucida (ZP), perivitelline space (PVS), first polar body (1PB) and oocyte. After that, other functional characteristics should be later observed during the ICSI procedure.

**Zona pellucida (ZP).** It may be regular or irregular in outline; thin, thick or mixed; round or oval; with or without internal septa. These defects are related to oocyte abnormal smooth endoplasmic reticulum (SER) structure and function. The abnormal SER may secrete lower (thin ZP) or higher (thick ZP) amounts of ZP precursors into the PVS, or secrete abnormal ZP precursors then causing denser, fractured or septated ZP. We have just found 3 cases with all oocytes showing the same type of abnormality. In these cases, the ZP was irregular, with outer projections, dense and thick. In all cases no pregnancy was ever achieved. Ultrastructural analysis then revealed oocyte abnormal higher levels of SER secretion of ZP precursors into the PVS.

**Perivitelline space (PVS).** It may be enlarged or decreased in width, and it may contain debris. The width of the PVS is directly correlated with the correspondent 1PB size, oocyte size, ZP thickness or presence of debris. Debris has distinct origins, and may arise from 1PB fragmentation, abnormal oocyte SER secretion, ooplasm fragmentation, ZP debris or follicular cell (FC) debris. We have found just a few cases with all oocytes showing the same type of abnormality. In some of these cases the oocyte shedded cytoplasmic fragments or exocytated giant lipofuscin material from secondary lysosomes into the PVS. In other cases, there was an abnormal higher level of SER secretion of ZP precursors into the PVS. In all cases no pregnancy was ever achieved.

**First polar body (1PB).** It may be regular or irregular in outline; of normal, decreased or increased size; and intact (single), divided or fragmented. The size of the 1PB has been correlated with aneuploidy. We have performed a prospective analysis on the impact in the clinical outcome of MII oocytes showing intactness, division or fragmentation of the 1PB. Elective embryo transfer of either kind of 1PB at the origin showed no significant differences in term pregnancies.

**Oocyte.** It may be regular or irregular in outline; of normal, decreased or increased size; it may be single or double; it may contain different types of inclusions; and it may be fragmented or degenerated. Surface irregularities and fragmentation are associated with degenerating oocytes. Abnormal sizes are frequently associated with aneuploidies. Inclusions may correspond to normal or abnormal organelles, with cell organelle abnormalities varying in severity.

The ultrastructure of the normal MII oocyte shows that the metaphase II plate is bellow the 1PB in a region that might be defined as the upper 1/3 of the oocyte volume. The MII oocyte has a smooth surface, multiple and short microvilli. Beneath the oolemma there are 1-2 rows of small dense cortical vesicles (CV), except immediately above the metaphase II spindle. Between CV there is a circumferential bundle of microfilaments and numerous very small SER vesicles. Bellow the CV layer, the oocyte cortex contains numerous mitochondria and three types of SER, small SER vesicles (with 1-2 attached mitochondria), large SER vesicles (with several attached mitochondria) and round large

aggregates of SER tubules. In the inner ooplasm, there is a predominance of small SER vesicles, several large SER vesicles, a few secondary lysosomes with dense contents (lipofuscin bodies), and rare rough endoplasmic reticulum cisternae and small lipid droplets.

CV are exocytated into the PVS when the oocyte fuses with the spermatozoon, or after cytoplasmic aspiration during ICSI. Exocytosis is thus caused by a naturally or artificially induced increase in free cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. The very small SER vesicles assist in this event, as they contain calcium binding proteins. The surface actin filament bundle is thereafter employed in the oocyte cortex contraction, which is responsible for sperm entry during IVF. The contents of CV contain numerous extracellular matrix proteins and enzymes. Once in the PVS, some enzymes attach to the internal ZP region and link ZP glycoproteins with disulfide bonds, rendering it denser and impenetrable by other sperm. Other enzymes diffuse to the ZP surface and digest sperm ZP receptors. Other enzymes remain in the PVS and digest the oocyte membrane surface receptor for sperm binding and fusion. On the contrary, extracellular matrix proteins coat the oocyte membrane outer surface to protect the embryo during development. Exocytosis of CV is named the cortical reaction, and is a main mechanism for the protection against polyspermia.

After sperm fusion (IVF) or ooplasm artificial activation (ICSI), SER tubule aggregates liberate a cytoplasmic component of unknown composition that participates in oocyte activation, and then disaggregate, disappearing definitively from the 1-cell embryo. Oocyte activation designates all changes experienced by the oocyte after gamete fusion. It includes the cortical reaction, the cortical wave of contraction, the opening of membrane channels for nutrient absorption, meiosis resumption, metabolic activation of the main physiological pathways, the induction of translation of the stored mRNAs and the activation of gamete DNA transcription. During oocyte activation, free mitochondria and the small and large SER vesicles migrate towards the cell center, accompanying the migration of pronuclei, and there remain in the perinuclear region. The single exception to this is the maintenance of those mitochondria and SER vesicles in the regions of contact between blastomeres. Migration of organelles from the cell cortex to the inner cytoplasm is responsible for the observed pale peripheric region in human zygotes.

Refractile bodies of MII oocytes correspond to normal lipofuscin secondary lysosomes. In very rare instances, we found two cases with giant lipofuscin secondary lysosomes, with later exocytosis of the lipofuscin materials into the PVS. In these cases no pregnancy was ever achieved. Central (more frequent) and excentric, small and large (more frequent), regions of increased granularity and densification correspond to abnormal vacuolization of the inner cytoplasm and contain an increased number of free (without mitochondria) small SER vesicles. They suggest an intrinsic abnormal structure and function of the SER similar to a state of accelerated oocyte ageing. Very large vesicles correspond to abnormal SER vacuoles. If contents are normal, they appear as smooth round areas. If contents are replaced

by water and then become under tension, they tend to be larger and morphologically appear as protruding bright clear regions in the ooplasm. We have just a few cases showing all oocytes filled with large and very large vacuoles. In all these cases no pregnancy was ever achieved. Recent ultrastructural studies from our group revealed that very large SER vesicles are an intrinsic component of GV oocytes. Thus, SER vacuoles in MII oocytes correspond to an abnormal development of that component, whose severity compromises the normal response at ICSI or the developmental potential of the embryo.

**ICSI.** Several functional oocyte aspects should be strictly evaluated during microinjection in the following order: resistance of the ZP to the penetrating injection micropipette, resistance of the oocyte membrane (oolemma) to the penetrating injection micropipette, width of the aspirated oocyte volume and viscosity of the ooplasm during retraction of the injection micropipette. A severe decrease in the resistance of the ZP to penetration reveals an abnormal ZP structure. It should thus be expected a compromised oocyte SER function. In the few cases where oocytes exhibited this type of defect, we also found a decreased resistance of the oolemma, followed by deficient sealing and ooplasmic shedding into the PVS, eventually causing oocyte degeneration. Deficient resistance of the oocyte membrane should raise suspicion of a deficient actin filament bundle structure, which is frequently linked to the above described consequences. The width of the aspirated oocyte volume directly relates to the resistance of the oocyte internal cytoskeleton. We divide the oocyte cytoskeleton resistance into 4 levels, with distances measured from the center of the oocyte up to the outer level of the aspirated volume of the ooplasm inside the microinjection pipette, after breaking that resistance: from the cell center to the oolemma, from the cell center to the outer border of the ZP, from the cell center to 2x the thickness of the ZP, and from the cell center to >2x the thickness of the ZP. In practice, the longer the volume aspirated, the worse the prognosis for embryo development. In a few cases we observed that all oocytes exhibited an increased viscosity of the ooplasm during retraction of the injection micropipette. This is characterized by gluing of sperm and ooplasm to the injection micropipette tip, sometimes with extrusion of the male gamete and shedding of ooplasm contents into the PVS. This might be overcome by repeating ooplasm aspiration, by rotating the injection micropipette during retraction, and by compressing the ZP against the oolemma until it completely seals. Nevertheless, these oocytes frequently degenerate. Increased viscosity might represent the other side of decreased oolemma resistance, being probably associated with a defective actin filament bundle structure similar to that induced by cytochalasin B to render it viscous for enabling oocyte enucleation.

### Acknowledgements

We acknowledge E. Oliveira, A. Alves and J. Carneiro for assistance in transmission electron microscopy. The present study was partially supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) of the Ministry of Science and Technology and Superior Education through public Portuguese governmental and European community PhD grant to R. Sá (SFRH/BD/23616/2005) and research grants to M. Sousa (POCI/SAU-MMO/60709/60555/59997/04;UMIB).

## References

### Mechanisms of human oocyte activation

Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9:511-8.

Tesarik J, Sousa M. Comparison of  $Ca^{2+}$  responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62:1197-1204.

Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1995; 63:343-9.

Tesarik J, Sousa M, Mendoza C. Sperm-induced calcium oscillations of human oocytes show distinct features in oocyte center and periphery. *Molec Reprod Develop* 1995; 41:257-63.

Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique:  $Ca^{2+}$  fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil Steril* 1995; 64:770-6.

Sousa M, Barros A, Tesarik J. The role of ryanodine-sensitive calcium stores in the calcium-oscillation machine of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:265-72.

Tesarik J, Sousa M. Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:383-6.

Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J. Effects of protein kinase C activation and inhibition on sperm-, thimerosal-, and ryanodine-induced calcium responses of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:699-708.

Heyers S, Sousa M, Cangir O, Schmoll F, Schellander K, van der Ven H, Montag M. Activation of mouse eggs requires multiple sperm factors but not sperm PLC $\gamma$ 1. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166:51-7.

Montag M, Heyers S, Sousa M, Cangir A, Schmoll F, Schellander K, Van Der Vem H. Calcium release and pronuclear formation in mouse and human oocytes is dependent on multiple factors from sperm cytosol. *Hum Reprod* 2000; 15:S165-166.

### Haploidization and cloning

Tesarik J, Nagy ZP, Sousa M, Mendoza C, Abdelmassih R. Fertilizable oocytes reconstructed from patients somatic cell nuclei and donor ooplasts. *Reprod Biomed Online* 2001; 2:160-4.

Ribas R, Oback B, Ritchie W, Chebotareva T, Ferrier T, Clarke C, Taylor J, Gallagher E, Maurício AC, Sousa M, Wilmut J. Development of a zona-free method of nuclear transfer in the mouse. *Cloning & Stem Cells* 2005; 7, 126-38.

Ribas R, Oback B, Taylor J, Maurício AC, Sousa M, Wilmut J. Cloned mouse produced using a zona-free method of nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17:180-1.

Ribas RC, Taylor JE, McCorquodale C, Maurício AC, Sousa M, Wilmut J. Effect of zona pellucida removal on DNA methylation in early mouse embryos. *Biol Reprod* 2006; 74:307-13.

Ribas RC, Oback B, Ritchie W, Chebotareva T, Taylor J, Maurício AC, Sousa M, Wilmut J. Effect of the method of zona removal on development of cloned mouse embryos. *Cloning Stem Cells* 2006; 8:10-5.

Sá R, Sousa M, Cremades N, Alves C, Pinho MJ, Silva J, Barros A. Haploidization. *Rev Int Andrologia* 2006; 4:9-24.

**Ultrastructure of normal human oocytes**

Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. *Hum Reprod* 1990; 5:613-8.

Sousa M, Tesarik J. Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9:2374-80.

Sousa M, Barros A, Tesarik J. Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmic reticulum organization in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:967-77.

Sousa M, Barros A, Silva J, Tesarik J. Developmental and cell-cycle-related changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:83-90.

Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J. Role of  $Ca^{2+}$  oscillations during human preimplantation embryo development. *Ass Reprod Rev* 1997; 7:139-150.

Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J. Activation of the oocyte  $Ca^{2+}$  signalling. In: *Oocyte in vitro maturation and fertilization in the human*. Univ Bologna, 1998; pp37-41.

Luís A, Rocha E, Oliveira E, Silva J, Barros A, Sousa M. Stereological ultrastructural characterization of human oocytes at prophase I. *Hum Reprod* 2007; 22 (Suppl):i117.

**Pathology of the zona pellucida of human oocytes**

Barros A, Sousa M, Silva J, Almeida V, Rocha E. Aging, hyaluronidase removal of the cumulus, and microinjection do not affect the sperm binding potential of human oocytes. *J Assisted Reprod Genetics* 1997; 14:97-101.

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. *Hum Reprod* 2001; 16:2166-70.

Viana P, Oliveira E, Alves A, Sá R, Silva J, Barros A, Sousa M. Ultrastructural study of oocytes showing abnormal proliferation of the zona pellucida. A new cause of female sterility. *Hum Reprod* 2007; 22 (Suppl):i162.

**Pathology of the perivitelline space of human oocytes**

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions, with the fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997; 12:1750-5.

**Pathology of the first polar body of human oocytes**

Sousa S, Silva J, Viana P, Gonçalves A, Sousa M, Teixeira da Silva J, Oliveira C, Barros A. Morphology of the first polar body has no impact on fertilization, embryo quality and pregnancy rates. *Hum Reprod* 2003; 18:S150.

**Pathology of the cytoplasm of human oocytes**

Van Blerkon J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Techniques* 1990; 16:324-346.

Van Blerkon J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992; 7:379-90.

El.Shafie M, Sousa M, Windt M-L, Kruger TF. An Atlas of the Ultrastructure of Human Oocytes. A Guide for Assisted Reproduction. Parthenon Publishing Group, New York, 2000.

Windt M-L, Barros A, Sousa M. The intracytoplasmic sperm injection technique: pitfalls and essentials. In: Ultrastructure of Human Oocytes, El.Shafie M et al (eds), Parthenon Publishing Group, New York, 2000; pp:51-63.

Sousa M, Barros A, El.Shafie M. Failed fertilization in vitro: principles and evaluation of transmission electron microscopic images. In: Ultrastructure of Human Oocytes, El.Shafie M et al (eds), Parthenon Publishing Group, New York, 2000; pp:65-82.

El.Shafie M, Windt M-L, Kitshoff M, McGregor P, Sousa M, Wrantz PAB, Kruger TF. Ultrastructure of human oocytes: a transmission electron microscopic view. In: Ultrastructure of Human Oocytes, El.Shafie M et al (eds), Parthenon Publishing Group, New York, 2000; pp:83-173.

Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. Hum Reprod Update 2003; 9:237-49.

Hamamah S. Oocyte and embryo quality: is their morphology a good criterion? J Gynecol Obstet Biol Reprod 2005; 34:5S38-41.

Balaban B, Urman B, Isiklar A et al. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online 2006; 12:608-15.

#### **In vitro maturation of human oocytes**

Hartshorne G, Montgomery S, Klentzeris L. A case of failed oocyte maturation in vivo and in vitro. Fertil Steril 1999; 71:567-70.

Bernabeu, R., Barros, A., Cremades, N., Silva, J., Oliveira, C., Sousa, M. High rates of in vitro maturation, fertilization and development of germinal vesicle and metaphase I oocytes recovered from stimulated cycles and matured on Vero cell monolayers under cumulus-free conditions. Hum Reprod 1999; 14:S191-192.

Cremades N, Silva J, Alves C, Bernabeu R, Barros A, Sousa M. Genetical and developmental potential of germinal vesicle stage human oocytes matured in vitro. Rev IberoAmer Fertil 2000; 17:1-8.

Windt M-L, Coetzee K, Kruger TF, Marino H, Kitshoff MS, Sousa M. Ultrastructural evaluation of recurrent and in vitro maturation resistant metaphase I arrested oocytes. Hum Reprod 2001; 16:2394-8.

Cremades N, Alves C, Silva J, Bernabeu R, Barros A, Sousa M. Characterization by FISH of the chromosomal complement of immature and in vitro matured human oocytes. Hum Reprod 2001; 16:S188-189.

Alves C, Sousa M, Silva J, Barros A. FISH analysis of in vitro matured human oocytes. Hum Reprod 2004; 19:Si100.

Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A. FISH analysis of the human female meiosis in-vitro. Rev IberoAm Fertil Reprod Hum 2004; 21:A435-436.

#### **Preimplantation genetic diagnosis**

Carvalho F, Sousa M, Fernandes S, Silva J, Saraiva MJ, Barros A. Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). Prenatal Diagnosis 2001; 21:1093-9.

Alves C, Sousa M, Silva J, Barros A. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of robertsonian translocations: the portuguese experience. Prenatal Diagnosis 2002; 22:1153-62.

Carvalho F, Sousa M, Silva J, Fernandes S, Barros A. Familial amyloidotic polyneuropathy. Update of Portuguese preimplantation genetic diagnosis. Trends in Reprod Biol 2005; 1:29-39.

## Selection of the best spermatozoa at high magnification: Can we consider Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) as the new generation of ICSI?

Pierre Vanderzwalmen, Magnus Bach and Nicolas Zech

Institute für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie, Bregenz, Austria. CHIREC hospital Edith Cavell, Bruxelles, Belgium. Correo electrónico: pierrevdz@hotmail.com

### Introduction

There is an increasing awareness in the field of assisted reproductive technology (ART) of the need to reduce the incidence of multiple pregnancies by transferring a single embryo (SET). Consequently, embryologists are faced with the challenging task of selecting the best embryo from the cohort with a high chance to continue to develop and implant.

Even though this subject is still a matter of debate, it is now more and more accepted that prolonging embryo culture to day 5 may be a better strategy to correctly identify and select from a cohort those embryos with an overall higher potential to implant. (Papanikolaou et al., 2006; Zech et al., 2006).

The key to the success for eSET is being able to obtain viable blastocysts on Day 5, and we must be aware that selection of inadequate gametes may compromise embryonic development, resulting in failed implantation.

Selection of the best spermatozoon It is now well recognized that the ability to improve the selection of the best spermatozoa prior to ICSI may affect positively embryo development and pregnancy outcomes. Several promising sperm selection techniques have been reported. Ainsworth et al. (2005) developed an electrophoretic sperm isolation technique for selecting functional spermatozoa free from significant DNA damage. On the basis of functional criteria, Huszar et al. (2007) reported that spermatozoa that bind to hyaluronic acid are mature, have reduced frequency of chromosomal disomy and diploidy and are similar to those of the zona pellucida in conventional fertilization. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI)

Inadequate knowledge of the importance of various types of sperm defects (that are not detected during conventional ICSI at a magnification 200 to 400X), may have a negative impact on the outcome of IVF. With the introduction of motile-sperm organelle-morphology examination (MSOME), it is now possible to examine the fine nuclear morphology of motile spermatozoa, in real time, at a magnification of up to 12,500X.

Recent publications have demonstrated that selection of spermatozoa at high magnification is positively associated with pregnancy rates after day 3 embryo transfers for couples with previous failures of implantation. (Bartoov et al., 2003) and for patients with elevated degree of DNA fragmented spermatozoa (Hazout et al., 2003). However, in some semen samples, it is almost impossible to find a normal spermatozoon. Berkovitz et al. (2006) reported on low fertilization rates and a low percentage of top quality embryos on day 3 after IMSI with spermatozoa exhibiting a large panel of nucleus malformations in terms of shape, size and presence of vacuole. In a recent paper, Berkovitz et al. (2006) analysed more specifically the impact of the presence of nuclear vacuoles in the head of spermatozoa

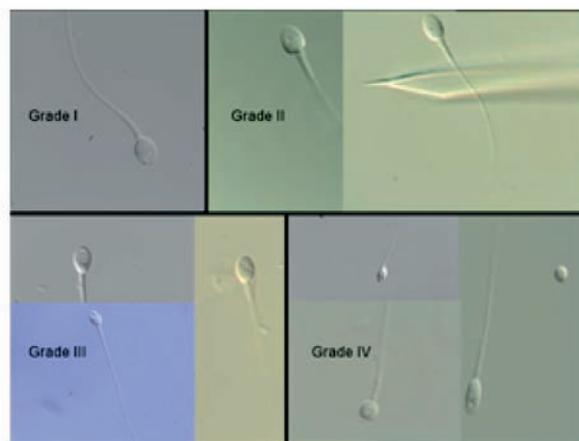
on embryo development and concluded that a positive effect on the rate of good quality embryos on day 3 is not fully apparent after a strict selection for only normal spermatozoa at high magnification. They could show that the presence of a defect at the level of the nucleus, such as nuclear vacuoles, reduces the IR and PR and furthermore was associated with higher rates of early abortion, even though there was no apparent decrease in the embryo quality on day 3.

### Material and methods

We have introduced IMSI into the IVF activities in our laboratory and two studies were undertaken

**Study 1:** The first study was designed to determine whether the existence of vacuoles in the nuclei of spermatozoa (which can not be detected with conventional ICSI at 200 or 400X magnification), was associated with the ability of the embryos to develop to the blastocyst stage. Spermatozoa were selected under a Nomarski interferential Leica AM 6000 inverted microscope, equipped with a variable zoom lens. The most normal looking spermatozoon was selected at magnification up to 12,500X and a photo was taken for further classification before injection. The spermatozoa were graded in 4 groups (Figure 1) according to the presence or size of the vacuoles: Grade I, no vacuole; Grade II, maximum of two small vacuoles (< 4% head surface); Grade III, at least one large vacuole; Grade IV, large vacuole and abnormal head shapes or other abnormalities.

**Figure 1.** Sperm classification grades used for IMSI. See text for details.



The injected oocytes were cultured until day 5 in Global medium (LifeGlobal) and the development of the embryos was correlated according to the different sperm categories.

**Study 2:** Currently, ICSI is performed after morphological selection of spermatozoa at 200X to 400X magnification using Hoffman modulation contrast. With such magnification, spermatozoa carrying defects of the head (i.e.: enlarged head, elongated head, tapered head, macrocephale, microcephale, amorphous), the neck (broken neck, cytoplasmic droplets) or the tail (broken tail, multiple tails) can be detected, and thus are not selected for injection if there is a morphologically normal spermatozoon in the preparation. Because vacuoles can not be detected during ICSI at 400X magnification, the question is whether IMSI could be a better strategy to select spermatozoa at a magnification of 6,000X to 12,500X. In order to evaluate whether IMSI could result in improved blastocyst formation and pregnancy rates compared to traditional ICSI, a prospective study, using sibling oocytes was undertaken to compare the outcome after selection of spermatozoa using the conventional ICSI procedure or after IMSI.

## Results

**Study 1:** Of a total of 307 selected spermatozoa, only 5% were completely free of any abnormalities. The majority of the spermatozoa presented small (Grade II, 61,5%) or large (Grade III, 28%) nuclear vacuoles alone. On Day 5, the blastocyst formation was related to the classification grade of injected spermatozoa: in Grade I and Grade II (73,3% and 45,0%) embryos reached the blastocyst stage out of which 46,7% and 25,4% respectively were classified as good quality blastocysts. Conversely, after IMSI with compromised sperm, only 9,3% (Grade III) and 0,4% (Grade IV) of embryos developed to the blastocyst stage, and 3,5% and 0,1% of those were of good quality.

**Study 2:** This study included 26 couples with at least 2 previous failures of implantation after ICSI. A total of 384 sibling oocytes (26 oocyte retrievals) were divided and allocated randomly between ICSI (203) or IMSI (181). In the IMSI group, only 6,0% of the selected spermatozoa were completely free of abnormalities, whereas the majority of the spermatozoa presented small (Grade II 56%) or large (Grade III 43%) nuclear vacuoles alone, or were associated with other abnormalities (Grade IV 9%). On Day 5, IMSI resulted in a significantly higher proportion of blastocysts (IMSI 38% versus ICSI 20%  $P < 0,001$ ) and good quality blastocysts, (IMSI 16% versus ICSI 6%  $P < 0,01$ ) The majority of the transfers ( $n = 19$ ) that resulted in 9 ongoing pregnancies (47%) were performed with embryos that originated only from the IMSI group. Four pregnancies were obtained after transfer of a combination of embryos from the IMSI and ICSI groups.

## Discussion

Our results show that the proportion of embryos developing to the blastocyst stage is directly correlated with specific morphological head malformations, such as vacuoles. Because vacuoles exert a negative effect on embryo development, it is now time to investigate their origin and under what circumstances the frequency of such vacuoles increases. In this way, a treatment may be offered, or a strategy could be established, to reduce their appearance. These observations agree with the results of previous studies that point to possible early and late paternal effects, both of which could affect early embryonic development. We suggest that a correlation exist between the presence of irregular nuclei with vacuoles and damage to the integrity of spermatozoa such as defects in sperm chromatin packaging.

The usefulness of the IMSI technique is demonstrated in the sibling oocytes injection study comparing conventional ICSI with IMSI, in that selection of a good spermatozoon can be missed by the normal selection prior to ICSI. Therefore is it reasonable to consider IMSI as the next generation technique that will replace ICSI. Our results demonstrate that IMSI is beneficial to patients having repeated implantation failure. It remains to be determined whether IMSI would be beneficial to all patients.

It is now well admitted that compared to an early paternal effect, a late one may affect the competence of embryos to developed to the blastocyst stage. In order to bring valuable arguments on the importance of selection of spermatozoa without large nuclear vacuoles we have to find answers to several pending questions. The origin and the factors that induce the formation of vacuoles and why vacuoles affect negatively the outcome of embryo development and pregnancies remain to be elucidated. It is well recognize that several reasons such as, abortive apoptosis during meiosis I, or faulty chromatin remodelling during spermiogenesis and finally oxidative stress, may cause sperm DNA fragmentation that correlates with embryo development to the blastocyst stage and with pregnancy outcome. According to) the integrity of the sperm chromatin may play the most important role, particularly in ICSI, where most of the natural selection mechanisms are bypassed.

An open question is if selection and injection of spermatozoa without vacuoles correlates to injection of spermatozoa devoid of DNA damage. Just like the low IR reported after transfer of embryos which resulted from fertilization of oocytes with spermatozoa having high DNA fragmentation indice, the same could be true for spermatozoa with nuclear vacuoles. Can we assume that an association between DNA damage and presence of nuclear vacuoles exists? To find answers to such questions is very important as we know the negative influence of DNA fragmentation not only on pregnancy outcome but also on the next generation. Some studies are in favour of a correlation between chromatin defects and the presence of vacuoles. A significant negative relationship between the size of the nuclear vacuoles and chromatin stability assessed by sperm chromatin structure assay was reported by showed that the chromatin material of sperm from patients with early pregnancy loss was either compact or partially compact and had irregular nuclear border with larger vacuoles, suggesting that the presence of vacuoles may reflect molecular defects responsible for abnormal chromatin remodelling during sperm maturation. We may suggest that spermatozoa with vacuoles indicate incidence of nuclear abnormalities leading to anomalies of sperm chromatin packaging, impairment in chromatin decondensation and incomplete nuclear remodelling during the process of spermatogenesis that will affect the outcome embryo development and pregnancies.

Since no statistical significant difference in embryo quality is observe up to day 3 reinforces the idea that no association with sperm DNA damage has been found for the early paternal effect. The late paternal effect is associated with an increased incidence of sperm DNA fragmentation .

The importance of establishment of a new spermocytogramme, using the IMSI criteria, will allow us to define a threshold for evaluation of the developmental potential of a single spermatozoon. Moreover, analysis of the sperm according this new classification could provide information on the technique to be used, conventional ICSI or IMSI, and to allow us to decide which patients may benefit from IMSI at the first attempt. In conclusion, research in the field of gamete selection is mandatory in order to increase the rate of good embryos that will develop to the blastocyst for eSET

## References

Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2005; 20:2261-70.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman, A, Artzi S, Gross M and Barak Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003; 80:1413- 19.

Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D and Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006; 21:1787-90.

Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:19-25.

Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, Ozkavukcu S. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:650-63.

Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A and Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006; 354:1139-46.

Zech N, Lejeune B, Puissant F, Vanderzwalmen S, Zech H, Vanderzwalmen P. Prospective evaluation of the optimal time for selecting a single embryo for transfer: day 3 versus day 5. *Fertil Steril* (In press).

## MANTENIMIENTO DE LA PLURIPOTENCIA DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Ángel Raya

ICREA Research Profesor. Center for Regenerative Medicine in Barcelona. Correo electrónico: [araya@cmrb.eu](mailto:araya@cmrb.eu)

Las células madre embrionarias (ES) son líneas celulares permanentes derivadas de pre-embriones en las que se combinan las capacidades de auto-renovación ilimitada y pluripotencia a la vez que mantienen un cariotipo normal. Gran parte de nuestro conocimiento actual sobre los mecanismos que regulan la pluripotencia de las células ES procede del estudio de líneas celulares de ratón, en las que se ha identificado una serie de requerimientos extrínsecos e intrínsecos para la misma.

A pesar de compartir elementos de un módulo intrínseco de *stemness*, los mecanismos moleculares que regulan la pluripotencia y auto-renovación de las células ES de ratón y humanas parecen diferir. Por otra parte, las bases celulares que determinan la pluripotencia de las células ES de ratón o humanas no han sido investigadas con detalle hasta el momento. En este estudio mostramos que la auto-renovación de células ES indiferenciadas depende, al menos en parte, de su capacidad para revertir la diferenciación inicial de progenitores comprometidos. También proporcionamos evidencia experimental sobre las interacciones moleculares específicas entre determinantes intrínsecos y extrínsecos de pluripotencia y los mecanismos de retroalimentación que se establecen entre los mismos y que son responsables de este proceso. En conjunto, nuestros resultados contribuyen a clarificar los mecanismos moleculares que regulan el mantenimiento de la pluripotencia de las células ES y proporcionan una puerta de entrada para definir las bases celulares de la misma.

## NON-MORPHOLOGICAL MARKERS FOR EMBRYO SELECTION

**Marc Van den Bergh**

IVF Laboratory, County Hospital KSB A.G. Baden; Switzerland. Correo electrónico: [Marc.VandenBergh@ksb.ch](mailto:Marc.VandenBergh@ksb.ch)

Embryo quality assessment based on morphological criteria is most probably the oldest and the most commonly practised method for embryo evaluation. All methods and scorings systems are based on the number of blastomeres, their shape and regularity and the presence of anucleated cytoplasmic fragments. Later it was suggested that those models should include the presence of multinucleated blastomeres. Several authors have demonstrated already in the early ages of ART the relationship between the multiple pregnancy rates and the number of morphological good embryos (Puissant et al., 1987; Staessen et al., 1992; Shulman et al., 1993; Van Royen et al., 1999; Pelnick et al., 1998). Morphological Embryo Scoring methods have been reviewed and it is clear that most fail to reflect chromosomal or metabolic competence (Baczkowski et al., 2004). Refinements of embryo scoring systems including zygote scoring system were proposed (De Placido et al., 2002) and early morphological characteristics are still used to evaluate the developmental potential of the embryo (Sjåblom et al., 2006; Scott et al., 2007). It is amazing that while morphological criteria are still used, there are no attempts to standardise the description of the commonly used morphological criteria and this in spite of the fact that everyone agrees that there is large underestimation of the percentage on fragmentation and large variations in embryo scoring between observers (Stanger, 2006). It is however possible to come concordant morphological embryo evaluation (Arce et al., 2006). If morphological parameters for embryo scoring are considered as poor diagnostic and predictive tools it has at least to be admitted that it is partially caused by the lack of standardisation.

Do embryologists dispose of better methodology to estimate what should be coined as “competence” and not quality? Practical and critical parameters to evaluate embryo competence should comply with the following requirements: non-invasive, fast, non-expensive, reproducible, standardised, specific and sensitive. Analysis by R.O.C. curves seems therefore the only appropriate methodology for data analysis, a seldom reported approach. Leaving morphological criteria behind the next thing one can easily look at is “kinetics” and early cleavage for embryo competence evaluation which has been reviewed and commented upon (Fancsovits et al., 2006). The bottom line is faster pronuclear breakdown results in faster cleaving embryos with better morphology and higher implantation rates, but the differentiation of faster cleaving embryos is only possible when observations are done at the right time, not too early and not too late.

Some authors stated that the way an embryo behaves in culture might be totally different from the way it behaves in its natural environment the fallopian tubes and the uterus, analysis of substances taken up from culture medium by the embryo may eventually not reflect its natural metabolism but could reveal how much the embryo is stressed. Literature about early mammalian embryo metabolism is abundant, however, there are fewer data concerning human embryo metabolism and its possible practical application. Due to its key position in between several major metabolic pathways glucose has been the molecule for metabolic assessments. Glucose, pyruvate and lactate so often called the “Holy Trinity” in energy metabolism have been the subject of some of our own work in which we attempted to use the glycolytic activity at the blastocyst stage to select the competent blastocyst(s) to transfer. Our data confirmed the early work of Gott (Gott et al., 1990) and it is obvious to us that the blastocyst with a low glycolytic activity belongs to the population with the highest implantation rate. However our practical daily experience revealed that the methodology was labour intensive, time consuming and not adapted for the routine IVF-laboratory. Similar studies on amino acid depletion/appearance in the culture media have emphasised the words of Henry Leese “The metabolically quiet embryo is the healthy/competent embryo” (Houghton et al., 2003).

Among specific substances secreted by the embryo during in vitro culture, s-HLA-g has been a subject of interest during the last years, but criticisms have been so strong that even the term artefact was used and at least one paper reported no detection of S-HLA-g at all (Van Lierop et al., 2002). Some other substances like serum and follicular leptin and embryonic-PAF have been mentioned but have not attracted further attention (Anifandis et al., 2005; Roudebush et al., 2002). The quest for specific markers for the assessment of embryo competence is still ongoing. Recently respirometry was proposed as a method to assess the quality of the embryo and correlations with sex, developmental stage, gene expression, morphology and metabolism were explored (Lopes et al., 2007; Lopes et al. 2007b, Lopes et al. 2007c). New microscopic techniques such as confocal microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy may allow us to better understand the time course of interaction between molecules and the distribution of important cell organelles, however to be applicable in the clinic the techniques must be totally harmless for the embryos (Sturmey et al., 2006; Ross et al., 2006).

It is more than likely that efficient embryo competence assessment is only possible by a clever combination of markers which must fulfil the following criteria : non-invasive, applicable after zygote to embryo transition, specific and sensitive, user friendly, low cost or in other words they should correspond to the KISS principle, Keep It Short and Simple.

### Selected readings

- Anifandis G, Koutselini E, Stefanidis I, Liakopoulos V, Leivaditis C, Mantzavinos T, Vamvakopoulos N. Serum and follicular fluid leptin levels are correlated with human embryo quality. *Reproduction* 2005; 130:917-21.
- Arce JC, Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgaard L, Sørensen P. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Hum Reprod* 2006; 21:2141-8.
- Baczkowski T, Kurzawa R, Gąbowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol* 2004; 41:5-22.
- De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote an embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002; 17:2402-9.
- Fancsovits P, Takacs F.Z., Tothne G.Z., Papp Z., Urnancsel T. Examination of Early Cleavage and its importance in IVF Treatment. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006: 367-72.
- Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1990; 5:104-8.
- Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2003; 18:1756.
- Lopes AS, Greve T, Callesen H. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 2007; 67:21-31.
- Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Lovendahl P, Greve T, Callesen H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod* 2007c; 22:558-66.
- Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Lovendahl P, Greve T, Callesen H. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*. 2007b 68:223-36.
- Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:960-3.
- Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987; 2:705-8.
- Ross PJ, Perez GI, Ko T, Yoo MS, Cibelli JB. Full developmental potential of mammalian preimplantation embryos is maintained after imaging using a spinning-disk confocal microscope. *Biotechniques* 2006; 41:741-50.

Roudebush WE, Wininger JD, Jones AE, Wright G, Toledo AA, Kort HI, Massey JB, Shapiro DB. Embryonic platelet-activating factor: an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 2002; 17:1306-10.

Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod*; 2007 22:230-40.

Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 1993; 60:123-6.

Sjöblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril* 2006; 86:848-61.

Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992; 57:626-30.

Stanger J. Review of estimation of fragmentation of human embryos using an internet based quality assurance scheme. *Alpha Biennial Meeting, Luzern* 2006.

Sturmey RG, O'Toole PJ, Leese HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*. 2006; 132:829-37.

Van Lierop MJ, Wijnands F, Loke YW, Emmer PM, Lukassen HG, Braat DD, van der Meer A, Mosselman S, Joosten I. Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 2002; 88:776-84.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 149:2345-9.

## INDICADORES DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE FIV

Ernesto Venga

IRAGA (Instituto de Reproducción Asistida de Galicia). Santiago de Compostela (A Coruña). Correo electrónico: [evigaa@iraga.net](mailto:evigaa@iraga.net)

### Introducción

Cualquier laboratorio de Fecundación *in vitro* (FIV) que se precie debe verificar que sus resultados se mantienen constantes y en niveles que le permitan competir con las mejores clínicas del mundo. La monitorización continua de los resultados, le permitirá conocer si es necesario revisar sus protocolos de trabajo, modificarlos, implementar unos nuevos o incluso incorporar nueva tecnología disponible en el mercado tecnológico.

Para ello se requiere el uso de indicadores de calidad, cuya medida determinará cuanto de bien se están haciendo los distintos procesos. Además, estos indicadores deberían estandarizarse entre los distintos centros para poder compararnos con los demás. Esto implica que un centro y otro deben medir lo mismo para que luego el cálculo de los indicadores sea el mismo.

El uso de los indicadores de calidad evitará que en nuestros laboratorios se presenten situaciones de resultados pobres o incluso nulos. Normalmente, a este tipo de eventos se suele llegar como resultado de una concatenación de varios factores aparentemente banales por sí mismos, pero que combinados son devastadores. Por tanto, el uso de dichos indicadores se incluye dentro del Manejo de Riesgos, permitiéndonos así reducir la frecuencia de eventos críticos, eventos que en algunas ocasiones al ser la concatenación de varios, son muy difíciles de superar (Reason, 1994).

De la misma forma, los indicadores de procesos o de calidad, son cruciales durante el desarrollo y el mantenimiento de un sistema de calidad en un laboratorio de FIV.

En el laboratorio de FIV podemos controlar todo aquello que podamos medir. Ahora bien, no es cuestión de medir por medir, y cuanto más mejor, sino que los indicadores que usemos deben reflejar los distintos procesos y áreas del laboratorio. Además, no sólo deben ser indicadores de puertas adentro, sino que deben reflejar la eficiencia total del programa, el coste-eficacia del mismo y la forma de proceder de cara al paciente, a los integrantes del equipo y a la sociedad. Así, cada centro deberá elegir que indicadores son los mejores en función de que áreas o procesos se hayan propuesto controlar o mejorar.

El objetivo del presente trabajo será exponer que indicadores podemos utilizar dentro del laboratorio de FIV para que luego cada uno de los laboratorios elija entre ellos aquellos que reflejen mejor las áreas a controlar dentro del Sistema de Calidad que tengan implantado.

El organismo americano “The Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations (JCAHO)” (JCAHO, 1991), describe el desarrollo de un Programa de Mejora de la Calidad Total para un Sistema de Salud como un proceso de 10 pasos. Concretamente el cuarto paso hace referencia a la identificación de indicadores de calidad y el quinto al establecimiento de los rangos de normalidad de los mismos. Es en estos dos aspectos en los que voy a centrar en trabajo para cumplir con el objetivo del mismo.

### **Identificación de indicadores de calidad dentro del laboratorio de FIV**

En el laboratorio de FIV se precisarán tantos indicadores de calidad como aspectos del mismo se precise monitorizar para que el servicio prestado a los pacientes sea un servicio de calidad (Wiemer et al., 2001). Los aspectos a monitorizar engloban tanto fases específicas como globales del proceso de FIV, así como la satisfacción de los propios pacientes.

Los indicadores de calidad deben cumplir (Mayer et al., 2003):

ser relevantes de los aspectos a identificar;

deben estar relacionados con los procesos y los resultados;

deben medir eventos específicos o aspectos del tratamiento que reflejen la calidad del servicio;

lo ideal es que sean objetivos, dado que son más fáciles de medir y cuantificar.

A la hora de identificar los indicadores de calidad también es importante consultar al resto del equipo que no pertenezca al laboratorio, dado que pueden percibir aspectos que no son evidentes desde dentro del laboratorio.

Los indicadores seleccionados también nos sirven para evaluar la habilidad de cada operario del laboratorio por separado. Un ejemplo claro de aspectos específicos son la tasa de fecundación (2PN) en la técnica de ICSI, así como la tasa de ovocitos degenerados tras la aplicación de la misma; y de aspectos globales serían la tasa de embarazo y la tasa de implantación. El seguimiento de las habilidades del personal del laboratorio nos sirve para valorar la necesidad de desarrollar planes de acción que impliquen formación del personal (además de los planes de formación generales) o actividades de formación continuada.

De la misma forma los indicadores de calidad nos sirven para evaluar el equipamiento que forma parte del laboratorio o bien para valorar nuevos equipos que se plantee su incorporación al laboratorio. Así, a la hora de adquirir por ejemplo un nuevo incubador de cultivo, se debe valorar la tasa de fecundación, la tasa de división embrionaria y la tasa de embarazo. De la evaluación del equipamiento surgirán planes de acción que impliquen el ajuste del mantenimiento del equipamiento o bien la renovación del mismo.

También nos sirven los indicadores de calidad para evaluar a nuestros proveedores de material específico del proceso de FIV. Por ejemplo se debe hacer el seguimiento de los distintos lotes de medios de cultivo evaluando cambios en la tasa de fecundación, tasa de división, grado medio embrionario, número medio de blastómeras, y tasa de embarazo. Todo ello nos permitirá evaluar la cadena de frío, las necesidades de mejora en la conservación de los medios y hasta si es necesario realizar un cambio de proveedor de los medios de cultivo si esto implica una mejora de la calidad.

Además de los indicadores de calidad propiamente clínicos, se deben incorporar indicadores que cubran el resto de aspectos de Manejo de la Calidad Total como la seguridad (informes de accidentes, informes de incidentes, formularios de identificación de muestras, índice de infección de pacientes), la comunicación (tasa de errores administrativos en los Informes Clínicos, retraso en la emisión de informes, falta de identificación de muestras), y la satisfacción de los pacientes (encuestas de satisfacción).

A la hora de finalmente decidir que indicadores elegimos para nuestro laboratorio, debemos tener presente que no por usar más indicadores nuestro Programa de FIV va a ser mejor que otro, sino que lo importante es saber que aspectos queremos controlar y si el indicador que usemos para ello es el adecuado. Por ello, antes de intentar utilizar todos los indicadores potenciales, se debe decidir que número de ellos será manejable para cada laboratorio priorizando aquellos que mejor reflejen la información que queremos obtener, cubriendo el mayor abanico de actividades a controlar como sea posible.

Una vez hecha la selección de indicadores, esta no debe ser estática, sino que periódicamente deben ser revisados para descartar unos, mantener otros, e incorporar otros prometedores si fuera necesario. Para ello, será necesario establecer una periodicidad en la medida de los indicadores de calidad, en la evaluación de la información que proporcionen y en la revisión de los mismos.

*Tabla resumen de indicadores de calidad:* a desarrollar durante la exposición del trabajo en el IV Congreso Nacional de ASEBIR 2007.

### **Establecimiento de rangos de normalidad para los indicadores de calidad**

Para cada indicador de calidad incorporado al laboratorio de FIV dentro del Programa de Manejo de la Calidad Total, se deben establecer los rangos de normalidad adecuados. Estos rangos establecen los niveles críticos de actuación para cada indicador dentro del sistema de calidad del laboratorio (Mayer et al., 2003).

Los valores de los rangos de normalidad se pueden expresar en formato positivo o negativo. Por ejemplo, se considera que la tasa de división embrionaria desde 2PN debe ser por lo menos del 95% (formato positivo); o menos del 5% de los embriones deberían bloquearse en su desarrollo en D+1 (formato negativo). Ahora bien, lo que se debe es establecer un consenso para expresar en la medida de lo posible, los niveles críticos de los indicadores siempre en el mismo formato para evitar errores tanto en el registro de las medidas como en la interpretación de las mismas.

Dado que los protocolos de trabajo no son idénticos de un laboratorio de FIV a otro, los rangos de normalidad para muchos indicadores pueden también variar entre laboratorios. Un ejemplo claro sería el establecimiento de los criterios utilizados por el laboratorio para decidir que embriones sobrantes son subsidiarios de congelación. Unos laboratorios establecen políticas muy restrictivas congelando únicamente embriones de alta calidad y otros congelan todos los embriones sobrantes independientemente de la calidad que tengan. Dado que la calidad se ha demostrado que influye en la supervivencia embrionaria post descongelación (Cohen et al., 1986), el rango de normalidad de la tasa de supervivencia embrionaria entre estas distintas políticas de congelación embrionaria, también será distinto.

Otros indicadores de calidad en cambio tendrán rangos de normalidad idénticos para todos los laboratorios. Es el caso de aquellos indicadores que miden fallos críticos del laboratorio, como la tasa de inseminaciones realizadas con semen erróneo, la tasa de transferencia de embriones de otra pareja, la tasa de inseminación de ovocitos por ICSI con semen erróneo, o la tasa de utilización de varias muestras de semen de banco para una única paciente y en un mismo ciclo de tratamiento. Todos estos indicadores deben tener un valor de normalidad cero para cualquier laboratorio.

Por todo ello, el establecimiento de los rangos de normalidad para cada indicador resulta difícil pero es crítico ya que en función de si somos más o menos exigentes, puede ocurrir que un indicador detecte un problema cuando no existe o que no sea capaz de detectar un problema cuando realmente si existe.

Una vez establecidos los rangos de normalidad, se debe tener presente que pueden existir factores clínicos que pueden influir sobre determinados indicadores sin que el hecho de que no estén dentro del rango de normalidad revele un problema real dentro del laboratorio. Realmente el establecimiento de los rangos de normalidad para determinados indicadores de calidad, va a estar influenciado de forma dinámica por la población de referencia que esté tratando el Centro de Reproducción en cada momento y de los protocolos clínicos que se estén aplicando a la misma. Un ejemplo claro es la calidad embrionaria, la cual se puede ver claramente influenciada por la calidad de los gametos proporcionados al laboratorio, por la técnica aplicada para su fecundación, así como si se les realiza a los embriones Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) o no, lo que influirá en clasificar a los embriones transferidos en función de su normalidad genética y no en función de su calidad embrionaria.

Además, se debe tener presente el número de procesos que realiza cada laboratorio, ya que un laboratorio que realice pocos procesos si estratifica los datos (por edad y por tipo de proceso) la validez estadística puede fallar. De la misma forma, la estratificación de la población tratada no sólo debe considerar datos demográficos o etiológicos de las pacientes que reciben el tratamiento, sino también el número de embriones transferidos. Por ello, a la hora de comparar la calidad del servicio prestado

entre distintos centros, se debe utilizar el indicador de tasa de implantación por embrión transferido. Esto hace que debamos instruir a nuestras pacientes a como interpretar los resultados una vez que estos son de acceso público (<http://www.hfea.gov.uk/docs/how-to-read.pdf>).

### Documentación

Una vez definidos los indicadores de calidad en función de los aspectos a controlar en el laboratorio de FIV, y establecidos los rangos de normalidad, debemos recoger y organizar las medidas de los mismos. Una vez que tenemos los datos debemos evaluarlos por si es necesario establecer un plan de acción para posteriormente valorar su eficacia, documentando el evento e informándolo.

La herramienta más utilizada para documentar las medidas de los indicadores de calidad es la gráfica de control de calidad o gráfica de Shewhart (Mortimer and Mortimer, 2005). En dicha utilidad definimos las unidades de medida, la periodicidad de la medida y los límites de los rangos de medida. Una vez que tenemos varias medidas, podemos establecer la media, los límites de aviso ( $\text{media} \pm 2\text{DS}$ ), y los límites de la medida ( $\text{media} \pm 3\text{DS}$ ). Estos últimos nunca pueden superar los establecidos previamente como los rangos de normalidad para el indicador de calidad. La gráfica obtenida será útil para evaluar la dispersión (alta frecuencia de ambos números, los bajos y los altos), la tendencia (movimiento progresivo de los valores reportados desde una medida anterior), y la variación (cambio repentino de la medida determinada).

Cuanto más organizado este el laboratorio, cuanto más robustos sean sus métodos, cuanto mejor sean las condiciones ambientales, cuanto más formado este el personal, o cuantos más pacientes maneje por cada unidad de tiempo establecida para la medida del indicador, existirá una reducción en la variabilidad inherente del indicador. Por ello, cada cierto tiempo será necesario valorar si se precisa recalcular los rangos de normalidad establecidos para el indicador pero siempre que se observe una mejora sistemática de la media.

Una vez que se establezca la rutina de monitorizar un panel establecido de indicadores de calidad, el laboratorio estará en condiciones de responder a la pregunta eterna cuando los resultados no son los esperados “¿Qué está funcionando mal en el laboratorio?”. Si todos los indicadores del laboratorio de FIV están dentro de los rangos establecidos, se puede concluir que todo funciona correctamente y que la causa habrá que buscarla en factores externos al laboratorio, ya sean clínicos o en la mayor fuente de variación entre los resultados de los tratamientos, la propia población tratada. De hecho, un laboratorio que disponga de un correcto panel de indicadores de calidad, será capaz de detectar cualquier problema temporal, incluso antes de que se vea reflejado en los indicadores globales de rendimiento del Programa de FIV.

Hay que tener presente que difícilmente detectaremos problemas si se realizan <5 punciones foliculares/mes, ya que sería muy difícil determinar el origen de un problema. Ahora bien, con una actividad elevada se pueden evaluar los indicadores del laboratorio cada 1 o 2 meses, siendo lo ideal calcular medias para los análisis estadísticos cada 20 ciclos.

Los rangos de normalidad deben ser determinados y listados en todos los formularios y gráficas. Todas las lecturas deben ser firmadas por un supervisor o director (normalmente el Director del Laboratorio) y las acciones correctivas deben documentarse. En caso de detectar una opción de mejora, se creará un Plan de Acción, y se pondrán los medios para implementarlo.

Es importante revisar los posibles problemas regularmente, por lo que los datos deben recogerse y analizarse de forma continua.

Las conclusiones, recomendaciones, acciones y seguimientos, deben quedar reflejados en un Informe, el cual será presentado al Director del Centro de Reproducción Humana Asistida, y una vez aprobado por el Director, lo ideal es presentarlo a todo el Equipo (clínicos, enfermeras, laboratorio, y administración).

## Bibliografía

- Cohen J, Simona RS, Fehily CB, Edwards RG. Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *Journal Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1986; 3:46-52.
- Joint Commision on Accreditation of Health Care Organizations 1991 Transitions – From QA to QI. Using CQI approaches to monitor, evaluate and improve quality. Bibliografía incompleta ¿verdad?
- Mayer JF, Jones EL, Dowling-Lacey D, Nehchiri F, Muasher SJ, Gibbons WE et al. Total quality improvement in the IVF laboratory: choosing indicators of quality. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(6):695-9.
- Mortimer D and Mortimer ST. Making it work. En: Mortimer D and Mortimer ST (eds) *Quality and Risk Management in the IVF Laboratory*. Cambridge University Press, Cambridge, 2005.
- Reason JT. Foreword. En: Bogner MS (ed) *Human Error in Medicine*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, New Jersey, 1994.
- UK Human Fertilisation and Embryology Authority's annual Patient's Guide to IVF Clinics, <http://www.hfea.gov.uk/docs/how-to-read.pdf>.
- Wiemer KE, Anderson A, Weikert L. Quality control in the IVF laboratory. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CH, Shoham Z (eds) *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. Martin Dunita, London, 2001. p.27-33.



Somos los primeros  
en conocerte ...

[www.centromedicinaembrionaria.com](http://www.centromedicinaembrionaria.com)

## SERVICIOS

### Diagnóstico genético preimplantacional

Estudio de aneuploidías (3, 5, 7, 9 y 12 cromosomas)  
Estudio de reorganizaciones cromosómicas  
Estudio de enfermedades monogénicas

### Estudio genético de la infertilidad masculina

Biopsia testicular  
Estudio de meiosis  
FISH en espermatozoides  
Estudio de fragmentación del DNA  
Microdeleciones del Y (screening de 20 microdeleciones)  
Test CVBA (screening de 30 mutaciones del gen CFTR +  
polimorfismo IVS8-Tn)

## OTROS SERVICIOS

Biopsia embrionaria y fijación de blastómeros

Consejo Genético

Formación en biopsia y fijación

Álvarez de Baena, 4 · 28006 Madrid · Tf. 91 4115080  
Fax 91 411 50 81 · [dgpi@centromedicinaembrionaria.com](mailto:dgpi@centromedicinaembrionaria.com)

### Servicio de Diagnóstico Genético Preimplantacional

Dra. Esther Velilla García  
Dra. María Oter Renom  
Dra. Mercedes García Bermúdez  
Dra. Silvia Fernández Fernández  
Dra. Ana Colomar Torres

### Servicio de Andrología

Dr. Ferran García José

### Asesor Científico

Dr. Prof. Juan G. Álvarez



centro de medicina  
embrionaria

[www.centromedicinaembrionaria.com](http://www.centromedicinaembrionaria.com)

... y sabemos que  
crecerás sano



## TIPOS DE TRATAMIENTO DE LA ESTIMULACIÓN OVÁRICA Y MOTIVOS DE SELECCIÓN

**Francisco Fábregues**

Institut Clínic d'Obstetricia, Ginecologia i Neonatologia (ICGON). Hospital Clínic. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.  
Correo electrónico: fgasol@clinic.ub.es

### Introducción

Desde el principio de la fecundación *in vitro* (FIV), la estimulación ovárica ha sido una parte fundamental de las técnicas de reproducción asistida. El objetivo de la estimulación ovárica ha sido, conseguir un desarrollo folicular múltiple, que permita obtener un mayor número de ovocitos maduros y con ello mejorar las posibilidades de gestación (Oehninger and Hodgen, 1990; Fauser and Devroey, 2003). Este objetivo, se consigue interfiriendo en los mecanismos fisiológicos que determinan la selección del folículo dominante en la paciente normoovuladora, por ello, debe distinguirse de manera clara entre **inducción de la ovulación**, cuyo objetivo será lograr un desarrollo monofolicular en la paciente anovuladora y, la **estimulación de la ovulación**, donde lo fundamental va a ser desarrollar múltiples folículos, que permitan aumentar la rentabilidad de las técnicas de reproducción asistida (TRA), en base a poder seleccionar embriones de calidad para ser transferidos a la cavidad uterina.

### Bases fisiológicas

El diseño de una estimulación ovárica efectiva con gonadotrofinas requiere el conocimiento de los conceptos básicos sobre la dinámica folicular y sobre los papeles respectivos que la FSH y la LH desempeñan en la regulación del crecimiento y desarrollo de un folículo único en el ciclo ovárico natural.

En el momento del nacimiento, los ovarios humanos contienen alrededor de 2 millones de folículos detenidos en el estadio primordial de su desarrollo. A lo largo de la infancia, la adolescencia y la etapa adulta, es decir, a lo largo de toda la vida de la mujer, estos folículos primordiales van desarrollándose de manera que se produce una progresiva depleción de la reserva folicular. En el ser humano, la magnitud de la depleción de la reserva de folículos primordiales depende de la edad, y es máxima durante la segunda mitad del desarrollo fetal intrauterino, pasándose de los 7-8 millones de células germinales existentes en el quinto mes de gestación, al millón de folículos primordiales, que tiene la niña al nacer. La vida reproductora se inicia con alrededor de 400000 folículos en la menarquia, y se propone que, posteriormente, la pérdida folicular es de alrededor de unos 1000 folículos por mes, si bien la depleción folicular se acelera con la edad, y especialmente a partir de los 35 años (Gougeon, 1993).

Periódicamente, pero de forma regular y continua, algunos de los folículos primordiales quiescentes son estimulados por factores intraováricos o desconocidos (en forma de una acción directamente estimulante o de cese de una acción inhibidora) para entrar en crecimiento, mientras que el resto de

folículos permanecerá en estado de quiescencia durante meses o años. Se desconoce cuál es el mecanismo de inicio del desarrollo folicular, pero lo que sí se sabe es que las gonadotrofinas no son necesarias y que la capacidad de respuesta folicular a la FSH sólo se adquiere cuando están formadas las células de la granulosa.

**Papel de la FSH.** El crecimiento folicular antral en los seres humanos depende de la acción tónica de la FSH hasta que se alcanzan diámetros de unos 5 mm. Los folículos que alcanzan éste diámetro están en un estadio precursor y en disposición de entrar en la fase final de maduración, siempre y cuando exista la estimulación adecuada de FSH. Antes de la pubertad, cualquier folículo que sobreviva hasta ésta fase de desarrollo acabará atresándose. Por el contrario, una vez iniciados los ciclos sexuales, los niveles de FSH circulantes al comienzo de cada ciclo menstrual constituyen un estímulo suficiente para prevenir la atresia e iniciar así la maduración preovulatoria.

Una vez se inicia la involución del cuerpo lúteo y se produce una disminución en la producción de estrógenos, progesterona e inhibina, en el ciclo menstrual humano los niveles de FSH circulantes se elevan al final de la fase lútea. Esta denominada elevación interciclo de la FSH está íntimamente sincronizada con la ovulación, y los niveles de FSH comienzan a incrementarse 12 días tras el pico precedente de LH (Hall, 2000). El proceso de rescate, es decir, evitación de la atresia, de una cohorte de folículos por esta elevación interciclo de la FSH se conoce como proceso o fase de reclutamiento folicular. La cohorte de folículos reclutados está formada por un grupo de folículos que se encuentran en un estadio comparable de desarrollo. Habitualmente sólo uno de estos folículos resultará seleccionado para alcanzar la dominancia durante la fase folicular avanzada. Este parece ser el folículo en el que las células de la granulosa responden mejor a la FSH y por tanto sería el primero capaz de sintetizar estrógenos. El resto de folículos, debido al descenso de la FSH que se produce después involucrarían hacia la atresia.

De lo citado anteriormente, aparecen dos conceptos que van a ser fundamentales a la hora de plantear una estimulación ovárica. Por una parte, el concepto de "umbral de FSH" (*FSH threshold*), que sería aquel nivel plasmático de FSH capaz de iniciar el reclutamiento folicular, y el de "ventana de FSH" (*FSH window*), que se refiere al número de días que los niveles de FSH se mantienen por encima del umbral citado.

**Papel de la LH.** La exposición tónica a la LH promueve la capacidad de respuesta folicular a la FSH durante el reclutamiento y la selección folicular. Será fundamental para la síntesis de andrógenos a nivel de la teca del folículo seleccionado, que sirvan de sustrato para sintetizar estrógenos en las células de la granulosa y así permitir un descenso en los niveles plasmáticos de FSH, que llevarán a la atresia a los folículos no seleccionados para la dominancia. La LH es fundamental en la segunda mitad de la fase folicular para la maduración, tanto folicular como ovocitaria. No obstante, los folícu-

los expuestos a niveles excesivamente altos de LH en la fase folicular avanzada entran en atresia o se luteinizan prematuramente (Hillier, 1993). Por lo tanto, los folículos en desarrollo parecen tener unas necesidades determinadas de LH por encima de las cuales el desarrollo normal cesa. Este también es un aspecto fundamental a tener en cuenta en las diferentes pautas de estimulación ovárica, es lo que se conoce como el “techo de la LH” (LH *ceiling*).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, cuando se trata de plantear una pauta de estimulación ovárica para un ciclo de FIV debemos alcanzar los siguientes objetivos:

- 1º) Inhibir el incremento interciclo de la FSH, que resulta fundamental en el reclutamiento y selección folicular.
- 2º) Mantener un bloqueo hipofisario durante la estimulación gonadotrófica para evitar picos endógenos de LH que provoquen una luteinización prematura de los folículos.
- 3º) Superar el valor “umbral” y ampliar el periodo de “ventana” de FSH para conseguir un desarrollo multifolicular.
- 4º) Mantener los niveles de LH durante la estimulación ovárica en unos márgenes aceptables y que no superen niveles plasmáticos que podrían ser deletéreos para el desarrollo folicular.

### **Inhibición del incremento interciclo de la FSH y bloqueo hipofisario durante la estimulación**

En el año 1971 fue aislado y se determinó la estructura del GnRH (Schally et al., 1971). Es un decapeptido secretado por el hipotálamo y que liberado de forma intermitente estimula la síntesis y secreción de FSH y LH hipofisarias. Reemplazando uno o dos aminoácidos de su estructura se obtuvieron los **análogos agonistas de la GnRH**, descubriéndose posteriormente que, administrados de manera continua provocaban inicialmente un incremento de los niveles plasmáticos de FSH y LH (efecto *flare up*), pero posteriormente se conseguía un estado de desensibilización hipofisaria debido a la ocupación masiva e internalización de los receptores hipofisarios de la GnRH (Guillemin et al., 1971).

Otras modificaciones en la estructura de la GnRH han permitido disponer en los últimos años de los **análogos antagonistas de la GnRH**. Si bien las primeras generaciones de estos fármacos no pudieron utilizarse en clínica por sus efectos secundarios, la tercera generación de los mismos se está utilizando con buenos resultados. Los antagonistas, a diferencia de los agonistas producen un bloqueo inmediato de los receptores de la GnRH, provocando una inhibición rápida y reversible en la liberación de gonadotropinas (Fauser and Devroey, 2005). Primero con los análogos agonistas y ahora también con los antagonistas se ha conseguido reducir de manera casi completa la presencia de luteinizaciones prematuras y con ello el gran número de cancelaciones que por éste motivo tenían lugar en los primeros años de la FIV (Healy and Rogers, 1986).

Los análogos agonistas de la GnRH (nafarelina, triptorelina y leuprolide) se pueden utilizar con dos pautas diferentes: 1ª) Protocolo largo, que consiste en iniciar el análogo en fase lútea media del ciclo

precedente al de la estimulación ovárica, manteniéndolo hasta la administración de HCG. Esta pauta consiste en administrar el análogo durante unas dos semanas y de esta manera se inicia la estimulación con gonadotrofinas una vez se ha conseguido la quiescencia folicular (inhibición del incremento interciclo de la FSH). También es posible iniciar esta pauta en el primer día del ciclo, sin embargo a efectos de planificación y comodidad se prefiere el inicio en fase lútea. 2º) Protocolo corto, que consiste en iniciar el análogo en fase menstrual e iniciar el tratamiento con gonadotrofinas inmediatamente después, aprovechando el *flare-up* en la liberación de gonadotrofinas.

Un metaanálisis que compara ambos protocolos de utilización de análogos agonistas demostró que el protocolo largo permite obtener un mayor número de ovocitos y también de gestaciones, aunque es necesario un mayor número de unidades de gonadotrofinas (Daya, 2000).

Los análogos antagonistas se utilizan con el objetivo fundamental de realizar pautas de estimulación más cortas, ya que se administran cuando la estimulación gonadotrófica ya se ha iniciado y el único objetivo es impedir los picos de LH responsables antaño de las luteinizaciones prematuras. Se dispone en la actualidad del ganirelix y del cetrotide y se pueden utilizar en regimen de pauta única (3 mg de cetrotide) en el 8º ó 9º día de la estimulación con gonadotrofinas (Olivennes et al., 1998), o bien, la pauta de dosis múltiples de 0,25 mg iniciadas en el 6º día de estimulación manteniéndose hasta el día de la HCG (*Ganirelix Dose-Finding Study Group*, 1998). Hay dos variedades de utilización de los antagonistas en dosis múltiple: la que inicia de manera fija el análogo en el 6º día de estimulación y la que demora su utilización cuando aparece al menos un folículo de 14 mm. Cuando se han comparado ambas pautas no se han objetivado diferencias significativas en los resultados obtenidos, salvo que en el protocolo flexible se utilizan menos días de tratamiento con antagonistas.

En un metaanálisis que analiza los resultados de cinco estudios randomizados que comparan los análogos agonistas *versus* antagonistas se concluye que el número de ovocitos es menor con antagonistas, pero no hay diferencias en el porcentaje de ovocitos maduros, fertilizados ni de embriones de buena calidad, sin embargo hay un 5% menos de tasa de gestación con antagonistas (Al Inani and Aboulghar, 2002).

En un exhaustivo metaanálisis en el que se analizan un gran número de estudios se concluye que la probabilidad de conseguir un hijo vivo tras una estimulación ovárica para FIV no depende del tipo de análogo utilizado para la supresión hipofisaria (Kolibianakis et al., 2006).

### Superación del valor “umbral” y del periodo “ventana” de FSH

Como se ha comentado anteriormente los conceptos de “umbral” y de “ventana” de la FSH van a ser fundamentales cuando se plantea una estimulación ovárica para un ciclo de FIV (Brown, 1978;

Fauser and Van Heusden, 1997). En 1978 Brown estableció que un determinado nivel de FSH al final de la fase lútea era capaz de conseguir el reclutamiento de un número variable de folículos (entre 10 y 20), de entre 2 y 5 mm de diámetro. La selección y dominancia de uno de ellos es debida, por una parte a una mayor sensibilidad de sus células de la granulosa a la FSH y, por otra a que la síntesis de estradiol en este folículo será responsable, mediante un *feed-back* negativo a nivel hipofisario de una disminución en la liberación de FSH, que provocará la atresia del resto de folículos reclutados. Este periodo en el que se mantiene elevado el nivel de FSH se ha denominado periodo de “ventana”.

Los resultados obtenidos de estudios en humanos han demostrado que el desarrollo folicular está más relacionado con el tiempo de exposición a la FSH (ventana) que con la dosis (umbral) y que el reclutamiento folicular múltiple es proporcional al acúmulo de FSH en suero independientemente de los niveles plasmáticos conseguidos con dosis iniciales elevadas (Fauser and Donderwinkel, 1993; Fauser, 1994).

Las **gonadotrofinas** constituyen los principales agentes para la estimulación ovárica en un ciclo de FIV. La administración diaria de éstos preparados se ha mostrado eficaz en la obtención de un crecimiento folicular múltiple y por consiguiente de la obtención de un número adecuado de ovocitos maduros. En la actualidad su utilización debe ser combinada con los análogos agonistas o antagonistas de la GnRH. Las preparaciones inicialmente utilizadas eran de hMG (conteniendo actividad FSH y LH), aparecieron después los preparados con FSH urinaria (purificada y altamente purificada) y en la actualidad se dispone de FSH y LH recombinantes.

Las dosis iniciales varían entre 100 y 300 UI/d y son ajustadas en función de la respuesta individual de las pacientes. No se ha demostrado que dosis más altas sean más eficaces incluso en pacientes de más edad, cosa que parece lógica ya que superar el “umbral” y “ventana” de FSH estará siempre limitado por aspectos propios de la reserva folicular de la paciente y con el tratamiento gonadotrófico sólo actuaremos a nivel de un grupo de folículos que han llegado al final del ciclo ovárico (reclutables) cuyo número dependerá del pool de folículos primordiales preexistentes (Macklon, 2006).

Múltiples estudios han comparado la eficacia de los diferentes preparados de gonadotrofinas y también metaanálisis posteriores han intentado resumir los resultados. En un metaanálisis que compara la tasa de embarazo por ciclo iniciado utilizando FSH recombinante, FSH urinaria y hMG se concluye que no hay evidencia suficiente para establecer que la rFSH, es superior a los preparados de origen urinario en términos de embarazo (Al Inane et al., 2003). Todos los metaanálisis publicados quedan resumidos en la figura 1. No obstante, parece que los preparados con rFSH presentan una tolerancia mejor (Albano et al., 1996) y su uso reduce el riesgo teórico de transmisión de priones (Shaked et al., 2001).

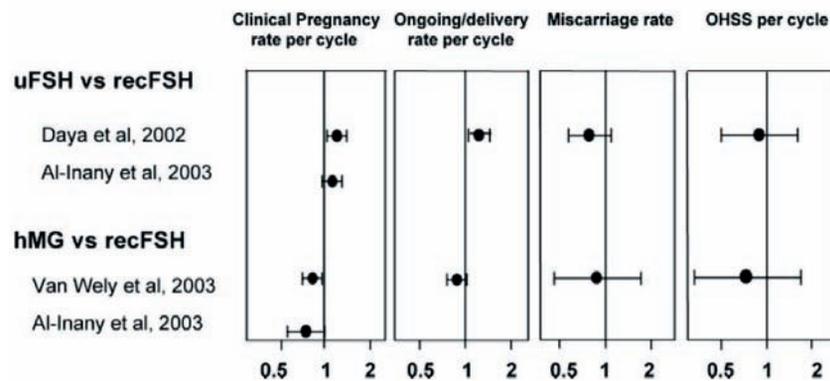


Fig 1: Resumen de los meta-análisis que comparan diferentes gonadotropinas en la estimulación de la ovulación para FIV-TE

### Mantenimiento de los niveles plasmáticos adecuados de LH

Se acepta actualmente que los niveles plasmáticos de LH durante la estimulación ovárica en un ciclo de FIV deben mantenerse dentro de unos márgenes que cuando no se alcanzan o se superan pueden resultar trascendentes en la evolución del ciclo (Shoham, 2002).

En los últimos años se ha establecido un gran debate sobre la conveniencia o no de utilizar preparados con actividad LH en los ciclos de FIV. Se ha publicado que una excesiva supresión en las concentraciones de LH podría resultar nocivo, tanto en términos de posibilidad de gestación como de la evolutividad de las mismas (Westergaard et al., 2000; Fleming et al., 2000). Así mismo, parece que niveles inferiores a 0,5 UI/L en fase folicular media podrían acompañarse de peores resultados. Otros estudios, han demostrado que los niveles plasmáticos de LH durante la estimulación no influyen en los resultados de la FIV (Peñarrubia et al., 2003; Merviel et al., 2004) y solamente el nivel de supresión hipofisaria, sobre todo con preparados *depot* podría acompañarse de niveles mas bajos de LH, cuando sólo se utilizan preparados de FSH, lo que aumentaría la duración del ciclo pero no influiría en los resultados (Balasch et al., 2003).

También se ha sugerido que en pacientes de más de 35 años sería necesaria la adición de LH, (Marrs et al., 2004) sin embargo ha habido estudios que no lo han demostrado y además en los que se ha visto que la sobredosificación de LH puede resultar nocivo (Fábregues et al., 2006).

El nivel de supresión de los niveles de LH se hace más evidente en los ciclos con antagonistas de la GnRH, sin embargo tampoco aquí se ha demostrado la eficacia de la suplementación con preparados con actividad LH.

### Selección de las pautas de tratamiento

Las estrategias terapéuticas utilizadas en FIV-TE deben producir embriones con excelentes tasas de implantación, al mismo tiempo que reducir al máximo las complicaciones médicas relacionadas con el procedimiento. Para este efecto es de vital importancia individualizar los protocolos de estimu-

lación de la ovulación en función de factores como la edad cronológica, la reserva ovárica y el estado endocrinológico de la paciente.

Antes de iniciar una pauta de estimulación debemos catalogar a las pacientes como normo, hiper o bajas respondedoras. Si bien, las opciones terapéuticas pueden ser variadas hay cierto consenso a la hora de elegir las.

Existen múltiples test basales y dinámicos que nos van a informar del estado de la reserva ovárica de la paciente. La determinación de FSH basal (junto con la LH y el estradiol) y el recuento de folículos antrales representan las pruebas con mayor poder predictivo en cuanto a respuesta, mientras que la edad sigue siendo el parámetro de mayor valor en cuanto a la posibilidad de gestación (Hendricks et al., 2005).

Si problemática resulta la posibilidad de una baja respuesta a la estimulación con gonadotrofinas, más lo es la hiperrespuesta. Se sabe desde hace tiempo que las pacientes con SOP representan un grupo de riesgo a la estimulación gonadotrófica ya que, a menudo su respuesta es explosiva y el riesgo de hiperestimulación es importante.

Normorespondedoras: Cuando la valoración clínica, endocrinológica y ecográfica de la paciente nos orientan hacia una respuesta "normal", la pauta más utilizada por comodidad y resultados es la que asocia a un **análogo agonista de la GnRh, en protocolo largo y la FSH**. El análogo se iniciará en fase lútea media y se mantendrá hasta el día de la administración de HCG. La dosis de FSH podrá ser fija, o bien en pauta de *step down* utilizando dosis ente 150 y 450 UI, que se podrán modificar en función de la respuesta de la paciente. Los antagonistas también se pueden utilizar, aunque no han mejorado los resultados obtenidos con la anterior pauta. Su ventaja fundamental sería el acortamiento del ciclo y el menor consumo de gonadotrofinas.

Bajas respondedoras: Son pacientes que no responden suficientemente a la estimulación hormonal convencional. En general, los marcadores de respuesta ovárica están alterados, pero en ocasiones la baja respuesta es inesperada y el diagnóstico se establece tras un primer intento de estimulación fallido.

La incidencia varía entre un 9 y un 24 % de los ciclos y esto es debido a la ausencia de un criterio uniforme de diagnóstico (Scout, 1996; Tarlatzis et al., 2003). Se considera que un desarrollo folicular mínimamente adecuado nos debe garantizar cuatro ovocitos para conseguir una media de dos embriones disponibles para transferir (Bancsi et al., 2002; Klinkert et al., 2004).

No hay en la actualidad un protocolo de ideal para la estimulación de estas pacientes. Todos los trabajos publicados presentan problemas metodológicos importantes ya que, los criterios de inclusión

son heterogéneos y el número de pacientes insuficiente.

En líneas generales, los resultados son mejores en las mujeres tratadas con **análogos de la GnRh en protocolo largo más gonadotrofinas**, por lo tanto, la primera estrategia consistirá en **aumentar la dosis de gonadotrofinas y disminuir la dosis del análogo**. A pesar de que los análogos antagonistas en algunos estudios han demostrado una menor tasa de cancelación y mayor número de ovocitos obtenidos, no hay evidencia suficiente como para considerarlos de elección en éstas pacientes.

Hiperrespondedoras: Es en éstas pacientes donde resulta especialmente necesario la predicción en la respuesta ovárica. Aunque se han descrito estrategias a aplicar durante el ciclo de estimulación para evitar cancelaciones (*coasting*, criopreservación embrionaria), debemos considerar éstas medidas como excepcionales y el hecho que debamos aplicarlas con frecuencia indica una mala valoración previa de las pacientes.

Un hecho ampliamente aceptado en las pacientes con presunta alta respuesta a la estimulación con gonadotrofinas es la necesidad de utilizar dosis más bajas (100-150 UI) y también parece ser que la FSH será de elección. En cuanto a la utilización de análogos de la GnRH, parece que los antagonistas permiten una estimulación más moderada. En un metaanálisis en que se han comparado los análogos agonistas (protocolo largo) *versus* antagonistas parece que el riesgo de hiperestimulación ovárica es menor, sobre todo porque en estos casos se podrá utilizar el antagonista como descarga ovulatoria en lugar de la hCG. No obstante son necesarios más estudios randomizados y con un mayor número de pacientes para sacar conclusiones más sólidas (Griesinger et al., 2006).

## Bibliografía

- Al Inany H, Aboulghar M, Mansour R, Serour G. Meta-analysis of recombinant versus urinary-derived FSH: an update. *Hum Reprod* 2003; 18:305-13.
- Al Inany H, Aboulghar M. GnRH antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17:874-85.
- Albano C, Smitz J, Camus M et al. Pregnancy and birth in an in Vitro fertilization cycle after controlled ovarian stimulation in a woman with a history of allergic reaction to human menopausal gonadotrophin. *Hum Reprod* 1996; 11:1632-4.
- Balasz J, Peñarrubia J, Fábregues F et al. Ovarian responses to recombinant FSH or HMG in normogonadotrophic women following pituitary desensitization by depot GnRH agonist for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2003; 7:35-42.
- Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ et al. Predictors of poor response in in-vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002; 77:328-36.
- Ben Rafael Z, Strauss III JF, Mastroianni LJ, Flickinger GL. Differences in ovarian stimulation in human menopausal gonadotropin treated woman may be related to follicle-stimulating hormone accumulation. *Fertil Steril* 1986; 46:586-92.

- Brown JB. Pituitary control of ovarian function: concepts derived from gonadotrophin therapy. *Aust N Z J Obstet Gynecol* 1978; 18:47-54.
- Daya S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD 001299.
- Fábregues F, Creus M, Peñarrubia J et al. Effects of recombinant human luteinizing hormone supplementation on ovarian stimulation and the implantation rate in down-regulated women of advanced reproductive age. *Fertil Steril* 2006; 85:925-31.
- Fauser B, Devroey P. Why is the clinical acceptance of gonadotropin-releasing hormone antagonist cotreatment during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization so slow? *Fertil Steril* 2005; 83:1607-11.
- Fauser BC, Devroey GD. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:236-42.
- Fauser BC, Donderwinkel P, Schoot DC. The step-down principle in gonadotrophin treatment and the role of GnRH analogues. *Baillieres Clin Obstet Gynecol* 1993; 7:309-30.
- Fauser BC. Step down FSH regimens in PCOS. En: Filicori M, Flagmini C (eds) *Ovulation Induction: Basic Science and Clinical Advances*. Excerpta Medica International Congress Series, 1064. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1994, pp:153-62.
- Fauser BJM, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: Physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine Rev* 1997; 18:71-106.
- Fleming R, Rehka P, Deshpande N et al. Suppression of LH during ovarian stimulation: effects differ in cycles stimulated with purified urinary FSH and recombinant FSH. *Hum Reprod* 2000; 15:1440-5.
- Ganirelix Dose-Finding Study Group. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). The ganirelix dose-finding study group. *Hum Reprod* 1998; 13:3023-31.
- Gougeon A. Dynamics of human follicle growth . A morphologic perspective. En Adashi EY (ed). et al. *The ovary*, Raven Press, New York, 1993; pp:21-39.
- Griesinger G, Diedrich K, Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH antagonist in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:628-38.
- Guillemin R, Amoss M, Blackwell R et al. Polypeptides antagonists of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor. *Gynecol Invest* 1971; 2:2-12.
- Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Metab* 2000; 74:600-7.
- Healy D, Rogers PA, McLachlan RI. Management of unsatisfactory superovulation responses in an IVF programme. *Hum Reprod* 1986; 1:20-26.
- Hendricks D, Mol BW, Bancsi L et al. Antral follicle count in the prediction off poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005; 83:291-301.
- Hillier SG. Ovarian stimulation with recombinant gonadotrophins: LH as an adjunct to FSH. En: Jacobs HS (eds). *The New Frontier in Ovulation Induction*. Parthenon, Carnforth, UK, 1993; pp:39-47.

- Klinkert ER, Broekmans FJM, Looman CWN, Te Velde ER. A poor response in the first in vitro fertilization cycles is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril* 2004; 81:1247-53.
- Kolibianakis EM, Collins J, Tarlatzis BC, Devroey P, Diedrich K, Griesinger G. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2006; 12:651-71.
- Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The Science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrine Rev* 2006; 27:170-207.
- Marrs R, Meldrum D, Muasher S et al. Randomized trial to compare the effects of recombinant human FSH with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:175-82.
- Merviel P, Antoine JM, Mathieu E et al. Luteinizing hormone concentrations after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration do not influence pregnancy rates in in Vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2004; 82:119-25.
- Oehninger S, Hodgen GD. Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Baillieres Clin Obstet Gynecol* 1990; 4:541-73.
- Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P et al. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Hum Reprod* 1998; 13:2411-14.
- Peñarrubia J, Fábregues F, Creus M et al. LH serum levels during ovarian stimulation as predictors of ovarian response and assisted reproduction outcome in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod* 2003; 18:2689-97.
- Schally AV, Baba Y, Nair RM, Bennet CD. The amino acid sequence of a peptide with growth hormone-releasing activity isolated from porcine hypothalamus. *J Biol Chem* 1971; 246:6647-50.
- Scott RT. Evaluation and treatment of low responders. *Sem Reprod Endocrinol* 1996; 14:317-37.
- Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z et al. A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 2001; 276:31479-82.
- Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2002; 77:1170-77.
- Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003; 9:61-76.
- Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 2000; 15:1003-8.

## INFERTILIDAD DE CAUSA GENÉTICA

Rafael Oliva

Grupo de Genética Humana, Unidad de Genética, Departamento de Ciencias Fisiológicas I, y Servicio de Bioquímica y Genética Molecular, Facultad de Medicina y Hospital Clínico, Universidad de Barcelona. Correo electrónico: [roliva@ub.edu](mailto:roliva@ub.edu)

### Introducción

La infertilidad se define como la incapacidad para tener descendencia a término pero no necesariamente implica la incapacidad para concebir. Para designar la incapacidad para concebir se utiliza el término esterilidad. Como ejemplos, un varón azoospermico es estéril, mientras que una mujer que se queda embarazada pero que aborta espontáneamente a los 2 meses es infértil, pero no estéril. Actualmente con los avances de las técnicas de reproducción asistida es posible tratar a la mayoría de pacientes con infertilidad o esterilidad, con lo que la incapacidad para concebir o para tener descendencia a término se convierte en relativa. Por ello existe una tendencia a utilizar el término de subfertilidad para aquellos individuos que espontáneamente no consiguen tener descendencia. La subfertilidad es un problema que afecta aproximadamente a un 15-20% de la población en edad reproductiva (1 de cada 5-7 parejas). El número de causas de infertilidad / esterilidad / subfertilidad es relativamente elevado. Se estima que aproximadamente en un 40% de los casos de infertilidad es debida a un factor masculino, un 40% es debida a un factor femenino y en un 20% es debida a un factor conjunto (Oliva and Ballescà, 1999). Este capítulo se pretende revisar los principales factores genéticos de infertilidad, esterilidad o subfertilidad así como las principales alternativas de diagnóstico genético disponibles, para terminar mencionando algunas de las estrategias actuales de investigación.

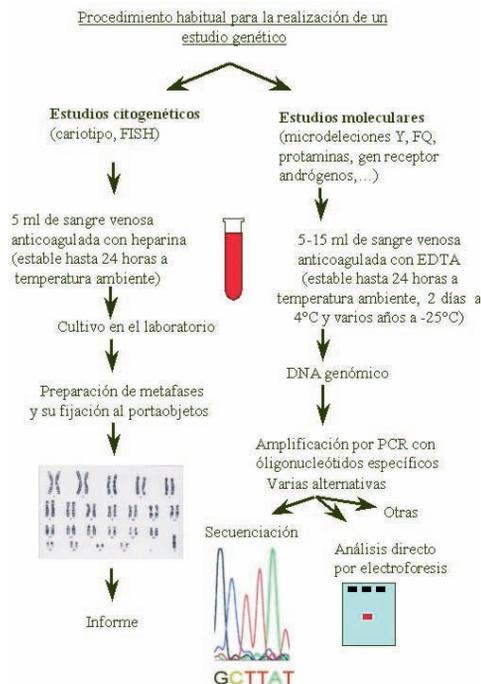
### Tipos de alteraciones genéticas y metodologías disponibles para su detección

Las alteraciones génicas pueden clasificarse, atendiendo a su aparición en las familias, en mutaciones o alteraciones cromosómicas transmisibles a través de generaciones o bien corresponder a mutaciones aparecidas *de novo* en la línea germinal de uno de los progenitores del paciente (Tabla I). Adicionalmente recientemente se está empezando a documentar en los varones infértiles la existencia de alteraciones adquiridas en los gametos consistentes en una pérdida generalizada de la integridad genómica en la línea germinal (Tabla I).

Las alteraciones génicas también pueden clasificarse atendiendo a su magnitud en 1.- mutaciones genómicas, aquéllas que implican la ganancia o la pérdida de todo un cromosoma entero o de varios cromosomas, 2.- mutaciones cromosómicas, aquéllas que afectan a una parte de uno o de varios cromosomas, o bien que implican un reordenamiento o traslocación, y 3.- mutaciones génicas, aquéllas que afectan a una sola base del DNA o bien a un número relativamente pequeño de bases o de genes (Oliva et al., 2004). Esta clasificación es arbitraria ya que cualquier mutación en un gen es a su vez



una mutación del cromosoma o del genoma. No obstante esta clasificación es útil a efectos de comunicación y es utilizada en la literatura. Las mutaciones genómicas y cromosómicas pueden detectarse mediante un cariotipo, mientras que las mutaciones génicas requieren técnicas de análisis genético molecular (Figura 1).



**Tabla I. Ejemplos de causas genéticas de esterilidad / infertilidad**

- Mutaciones genéticas, genómicas o cromosómicas heredadas:
  - Varón: Mutaciones CFTR
  - Traslocaciones cromosómicas balanceadas (ej.: t(13:14))
  - Mujer: Mutaciones del gen de la 21-hidroxilasa
  - Traslocaciones cromosómicas balanceadas (ej.: t(13:14))
- Mutaciones genéticas, genómicas o cromosómicas de novo (riesgo transmisión):
  - Varón: Microdelecciones del cromosoma Y
  - Síndrome de Klinefelter
  - Mujer: Síndrome de Turner
- Lesión adquirida del material genético (con riesgo para futuras generaciones?):
  - Varón: Alteraciones de la integridad del DNA

**Figura 1. Principales alternativas en los estudios genéticos de pacientes infértiles, estériles o subfértiles.**

Otro aspecto importante a considerar es la penetrancia de las alteraciones génicas. La penetrancia de una alteración génica concreta se define como la proporción de individuos que presentando esta alteración expresan el fenotipo. En los casos en los que la penetrancia es del 100% (o próxima) se habla de penetrancia completa o de que la alteración genética es causa del fenotipo (infertilidad /esterilidad / subfertilidad). En los casos en los que la penetrancia es del orden del 10 al 70% se considera como penetrancia incompleta y se refiere a que la alteración génica es un factor de riesgo del fenotipo (infertilidad / esterilidad / subfertilidad). En la tabla II se indican las principales causas y factores de riesgo genético de infertilidad en el varón.

**Esterilidad, infertilidad y subfertilidad en el varón**

Las tres principales causas de esterilidad en el varón azoospermico son 1.- microdelecciones del cromosoma Y, 2.- presencia del síndrome de Klinefelter (47, XXY; Figura 2), y 3.- presencia de agenesia de conductos deferentes debida a mutaciones en el gen de la fibrosis quística. Estas 3 causas explican la aparición del fenotipo en aproximadamente el 40% de los pacientes azoospermicos y son causas diagnosticables. Por lo tanto ante un paciente azoospermico está indicado practicar un cariotipo, un estudio de microdelecciones del cromosoma Y, y un estudio mutacional del gen de la fibrosis quística (Ballescà and Oliva, 1999).



Entre las causas frecuentes de infertilidad destacan las traslocaciones balanceadas. Este tipo de alteraciones cromosómicas suelen provocar infertilidad debido a la presencia de gametos desequilibrados que ocasionan la aparición de abortos de repetición en la mujer y debido a una disminución de la calidad seminal (Fraccaro et al., 1973). A parte de estas causas frecuentes se han descrito diversas mutaciones infrecuentes en diversos genes que también son causa de esterilidad o infertilidad en el varón (de la Chapelle, 1981; Berta et al., 1990; Margarit et al., 1998, 2000).

Pero la gran mayoría de pacientes infértiles no son azoospermicos, sino que presentan alteraciones variables en su seminograma (oligospermia, astenozoospermia, teratozoospermia) o incluso no presentan alteración alguna (normozoospermia). Se sospecha que una elevada proporción de este tipo de pacientes presenta alteraciones génicas del tipo de factor de riesgo. De hecho se conocen ya 26 genes o alteraciones génicas de los que existe evidencia de que se comportan como factor de riesgo de infertilidad en el varón (Krausz and Gianchi, 2007). De todos ellos el factor de riesgo más bien contrastado es la presencia de las microdeleciones parciales del cromosoma Y denominadas gr/gr (Repping et al., 2003; de Llanos et al., 2005; Ferlin et al., 2005; Lynch et al., 2005).

#### **Microdeleciones del cromosoma "Y" y gen DAZ**

Una de las primeras evidencias de que el cromosoma Y contiene genes importantes para la espermatogénesis provino de la identificación de varones infértiles con presencia de deleciones terminales del brazo largo del cromosoma Y (Tiepolo and Zuffardi, 1976). Sobre la base de estos resultados, estos autores propusieron la existencia de un factor de azoospermia (AZF) en Yq.

Más recientemente con las técnicas de aislamiento de genes se consiguió identificar un gen (DAZ; Deleted in Azoospermia) cuya deleción se ha demostrado ser la responsable de la azoospermia en estos pacientes con microdeleciones en el cromosoma Y (Reijo et al., 1985). Actualmente se sabe que un 8-10 % de los pacientes azoospermicos y un 1-2% de los pacientes oligospermicos presenta microdeleciones del cromosoma Y responsables de su fenotipo (Reijo et al., 1985; Oliva et al., 1998; Krausz and Giachini, 2007).

Es posible detectar la presencia de microdeleciones de Yq a través de PCR con oligonucleótidos específicos del gen DAZ, o de otros genes o regiones (Figura 3). Los pacientes azoospermicos o oligospermicos severos con microdeleción del cromosoma Y son estériles, pero actualmente a través de la técnica de ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoide) es posible que tengan descendencia. Si su descendencia es masculina, heredarán la misma microdeleción del padre, pero si es femenina no heredará la microdeleción. Por lo tanto la detección de microdeleciones del cromosoma Y es diagnóstica en este tipo de pacientes y permitir asesorar genéticamente a las parejas.



# P O N E N C I A S S E S I Ó N III

Oliva R., Infertilidad de causas Genéticas...

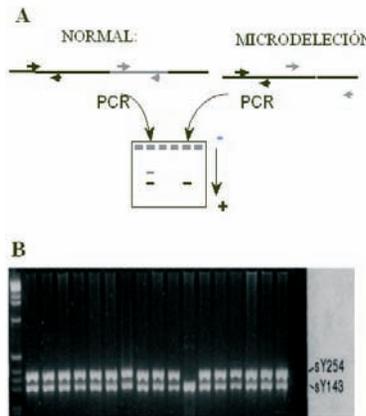


Figura 3. Detección de microdeleciones en el cromosoma Y.

**A:** Principio de la técnica a través de co-amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de secuencias del cromosoma Y.

**B:** Ejemplo de pacientes azoospermicos consecutivos estudiados en el laboratorio en donde se detecta la ausencia de amplificación del marcador sY254 en uno de los pacientes.

Adicionalmente la detección de microdeleciones del cromosoma Y también posee un valor pronóstico en los pacientes azoospermicos. Se conoce que la presencia de microdeleciones de la región AZFc posee un buen pronóstico pues es muy probable encontrar espermatozoides en una biopsia testicular que abrirá la posibilidad de realizar un tratamiento por ICSI. En cambio las microdeleciones en la región AZFa y b poseen un mal pronóstico en cuanto a recuperar espermatozoides en la biopsia testicular con lo que puede desaconsejarse proceder a esta técnica en este tipo de pacientes.

## Síndrome de Klinefelter

Hasta un 10% de los individuos azoospermicos presenta alteraciones citogenéticas, siendo el síndrome de Klinefelter la alteración más frecuente. El síndrome de Klinefelter es debido a un exceso de cromosomas X en el varón (Figura 2). La mayoría de los pacientes con el síndrome de Klinefelter son azoospermicos, pero algunos son oligospermicos. A través de la técnica de ICSI es posible conseguir que algunos pacientes con este síndrome tengan hijos.



Figura 2. Ejemplos de cariotipos presentes en pacientes infértiles. Arriba de todo se muestra el cariotipo presente en pacientes con síndrome de Turner, en el centro se muestra el cariotipo presente en pacientes con síndrome de Klinefelter, y abajo se muestra el cariotipo de un varón con una traslocación equilibrada 13:14.

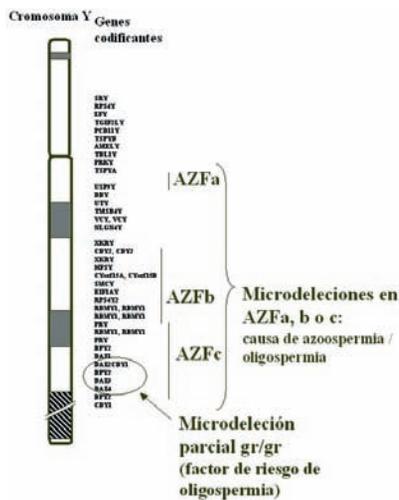




### Agenesia de conductos deferentes y mutaciones en el gen de la fibrosis quística

La principal causa de agenesia de conductos deferentes es la presencia de una mutación grave del gen CFTR en uno de los alelos asociada a una mutación leve (Casals et al., 1995; Larriba et al., 2005). La combinación de estas dos mutaciones (una grave en un alelo y otra leve en el otro alelo) es insuficiente para resultar en la aparición de fibrosis quística como enfermedad típica pulmonar o con afectación exocrina grave, pero es suficiente para ocasionar alteraciones durante el desarrollo conducentes a la agenesia de los conductos deferentes.

Los varones con este tipo de alteración presentan una azoospermia obstructiva. A través de punción en la parte proximal del deferente es posible recuperar espermatozoides con los que es posible tratar a estos pacientes mediante ICSI. En este caso resulta importante estudiar previamente a ambos miembros de la pareja para detectar o descartar la presencia de mutaciones del gen CFTR. Si ambos miembros fuesen portadores de mutaciones en este gen, sus posibles descendientes tendrían por lo menos un 25% de probabilidades de presentar fibrosis quística típica.



**Figura 4. Tipo de microdeleciones frecuentes en el cromosoma Y. Se indica las tres principales microdeleciones (AZFa, b y c) causales de azoospermia o de oligospermia severa así como el factor de riesgo de oligospermia (gr/gr).**

### Traslocaciones equilibradas.

La presencia de una traslocación equilibrada no implica ningún problema físico o médico para su portador al no faltar ni sobrar material genético. El único problema que tienen los varones portadores de una traslocación equilibrada es que durante la meiosis se pueden formar gametos desequilibrados. La mayoría de este tipo de gametos con dotación desequilibrada dan lugar a embriones no viables. Las parejas de los pacientes infértiles refieren haber tenido diversos abortos. Si la dotación es muy desequilibrada pueden incluso producirse embarazos subclínicos.

En los varones, la presencia de traslocaciones equilibradas también da lugar a oligospermia. El riesgo reproductivo de las traslocaciones equilibradas es que pueden dar lugar a embriones viables con un desequilibrio y por lo tanto con malformaciones o alteraciones graves. Que un desequilibrio pueda o no ser viable depende del tamaño de los segmentos cromosómicos implicados (a mayor tamaño más



inviabile) y del tipo de cromosoma. Por ejemplo, en la traslocación 13:14 (Fraccaro et al., 1973) los embriones con desequilibrio cromosómico son inviables. En cambio, también como ejemplo, ante una traslocación equilibrada que implique el brazo largo del cromosoma 21 existirá un riesgo importante de recién nacidos con síndrome de Down por traslocación. En cualquier caso ante la detección de una traslocación equilibrada está indicado siempre realizar un diagnóstico prenatal en caso de embarazo.

### **Causas infrecuentes de infertilidad en el varón**

Una de las primeras alteraciones genéticas descubiertas responsables de infertilidad en el varón fueron las traslocaciones del gen SRY al cromosoma X responsables de varones XX (de la Chapelle, 1981; Berta et al., 1990; Margarit et al., 1998, 2000). Si bien se trata de ejemplos paradigmáticos, la frecuencia de este tipo de alteraciones es muy baja (alrededor de 1 de cada 10.000 recién nacidos). Posteriormente se han indicado mutaciones de genes codificantes para proteínas implicadas en la regulación endocrina responsables de infertilidad en algunos pacientes (Mengual et al., 2003a; Krausz and Giachini, 2007). También se han descrito mutaciones en los genes de las protaminas como proteínas mayoritarias del núcleo de los espermatozoides (Oliva, 2006). Un listado completo de las causas genéticas infrecuentes de infertilidad está disponible en el catálogo de alteraciones génicas OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>).

### **Microdeleciones parciales gr/gr como factor de riesgo frecuente de infertilidad en el varón**

De entre todos los factores conocidos de riesgo genético de infertilidad en el varón el más contrastado en estudios independientes es la presencia de la microdeleción parcial del cromosoma Y conocida como gr/gr (Repping et al., 2003; de Llanos et al., 2005; Krausz and Giachini, 2007; Tabla II).

#### **Tabla II. Causas y factores de riesgo genético de infertilidad en el varón.**

Causas (mutaciones de elevada penetrancia):

- Mutaciones CFTR
- Traslocaciones cromosómicas balanceadas (ej.: t(13:14))
- Microdeleciones del cromosoma Y: AZFa, AZFb, AZFc
- Síndrome de Klinefelter

Factores de riesgo (polimorfismos de baja penetrancia):

- De la secuencia del cromosoma Y
- Microdeleciones parciales del cromosoma Y: gr/gr
- Haplogrupos del cromosoma Y
- Haplogrupos del DNA mitocondrial

Genes implicados en la regulación endocrina:

- Receptor de andrógenos (AR)
- Receptor de la FSH (FSHR)
- Receptor de estrógenos (ESR1 y 2)
- Aromatasa CYP19
- NRIP (nuclear receptor interacting protein)

Genes con funciones específicas en la espermatogénesis:

- DAZ-L (deleted in azoospermia like)
- Protamina 1 y protamina 2
- Proteínas de transición 1 y 2
- Peptidasa específica de unicuitina 26 (USP26)
- Helicasa testicular regulada por gonadotropinas (GRTH)
- Elemento modulador a la respuesta al AMP cíclico (CREM)
- Activador de CREM en el testículo (ACT )
- Oncogen KIT y ligando del oncogen KIT (KITG)

Genes responsables de funciones celulares básicas:

- Gamma polimerasa mitocondrial (POLG)
- Metilen-tetrahidrofolato reductasa reductasa (MTHFR)
- Glutation-5-transferasa (GSTM1)
- PHGPx (Phospholipid hidroperoxide glutation peroxidase)
- BRCA2 (cancer de mama 2)
- Metionin sintasa (MS) y metionin sintasa reductasa (MTRR)
- Apolipoproteina B

Esta microdelección gr/gr elimina 2 de las 4 copias del gen DAZ presentes en la región AZFc del cromosoma Y. La disminución de dosis génica presente en los pacientes con la microdelección gr/gr supone un factor de riesgo importante de oligospermia y de infertilidad. Dado que representa un factor de riesgo genético transmisible para oligospermia se recomienda su estudio a los pacientes en tratamientos de reproducción asistida (Krausz and Giachini, 2007).

### **Esterilidad, infertilidad y subfertilidad en la mujer.**

Las principales causas genéticas conocidas de esterilidad en la mujer son el síndrome de Turner, el déficit de 21-hidroxilasa en algunos casos y las traslocaciones equilibradas. La mayoría de abortos espontáneos siguen teniendo una causa desconocida ya que en la mayoría de los casos ambos miembros de la pareja presentan un cariotipo normal y no se detectan antecedentes familiares que puedan relacionarse. La elevada proporción de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos sugiere que los errores cromosómicos durante la gametogénesis son una causa importante de infertilidad.

### **Síndrome de Turner**

La principal causa cromosómica de esterilidad en la mujer es el síndrome de Turner (45,X; Ford et al., 1959; Figura 2). Algunas mujeres (1-2%) con síndrome de Turner han conseguido tener hijos, pero se cree que la mayoría de estas son mosaicos con líneas gonadales normales.

### **Déficit de 21-hidroxilasa**

El déficit de 21-hidroxilasa se asocia a alteraciones de la regla y por lo tanto una de las causas de infertilidad. En la mujer además asocia hirsutismo y otras alteraciones (ver Tabla III). Las alteraciones del gen de la 21-hidroxilasa abarcan desde mutaciones que destruyen la función del gen hasta muta-

ciones leves que sólo disminuyen la función del gen (White et al., 1986; Oriola et al., 1997; Oriola and Pavia, 1997; Tabla III). La identificación de un déficit de 21-hidroxilasa ante una mujer con infertilidad es importante no sólo como objetivo diagnóstico, sino también por las perspectivas de consejo genético que aporta. Una mujer afecta es también portadora obligada por lo que, dependiendo de si el marido es portador, su descendencia puede resultar afecta. Los principales riesgos derivados de la combinación de dos mutaciones graves son el fallecimiento por alteraciones hidroelectrolíticas en cualquier sexo y la virilización genital en el sexo femenino. No obstante conociendo el genotipo es posible prevenir la aparición de la clínica a través de tratamiento farmacológico preventivo (Oliva et al., 2004). El tratamiento con dexametasona durante el embarazo que previene el desarrollo de virilización genital en fetos de sexo femenino.

### Tabla III. Subtipos y principales características clínicas en la hiperplasia suprarrenal congénita

No clásica o tardía (actividad enzimática 21-hidroxilasa: 10-70%)

Sexo femenino: Trastornos menstruales, acné, hirsutismo, Infertilidad.

Sexo masculino: Puede pasar desapercibida.

Clásica virilizante simple (actividad enzimática 21-hidroxilasa : 3-10%).

Sexo femenino: Trastornos menstruales, acné, hirsutismo, masculinización de los genitales (clitoromegalia).

Sexo masculino: Virilización precoz.

Clásica con pérdida salina: Actividad enzimática 21-hidroxilasa :

0-3%. Sexo femenino: Trastornos menstruales, acné, hirsutismo, masculinización de los genitales.

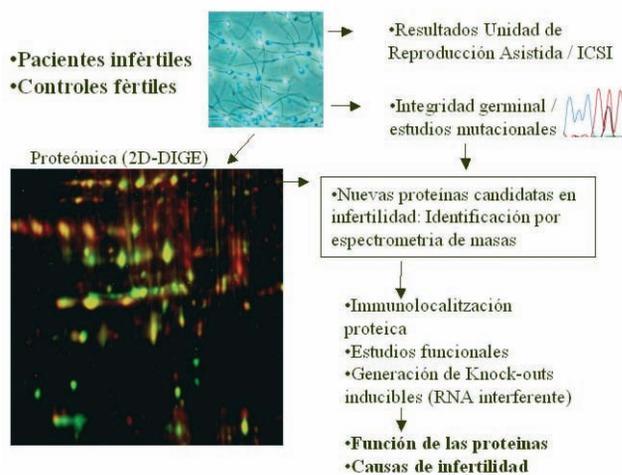
Sexo masculino: Virilización precoz y pérdida salina.

### Traslocaciones equilibradas

Al igual que en los varones la presencia de una traslocación equilibrada no implica ningún problema físico o médico para su portadora al no faltar ni sobrar material genético. El problema que presentan las mujeres portadoras de una traslocación equilibrada es que durante la meiosis se forman gametos desequilibrados. Dependiendo del tamaño de desequilibrio y del cromosoma al que afectan se generan embriones no viables y abortos de repetición o embriones viables con un desequilibrio y por lo tanto malformaciones o alteraciones graves. Por ejemplo, la presencia de una traslocación 13:14 equilibrada en la mujer resulta en embriones no viables. Esta traslocación es también la más frecuente mujeres infértiles con abortos de repetición. Ante la detección de una traslocación equilibrada se tiene que indicar realizar un diagnóstico prenatal en caso de embarazo dado el riesgo de embriones viables con desequilibrio cromosómico.

### Investigación de las causas genéticas de infertilidad, esterilidad o subfertilidad

Los métodos de análisis genético de ligamiento aplicables en potencia a la mayoría de enfermedades hereditarias no resultan apropiados en el caso de la infertilidad ya que de forma natural el fenotipo no se transmite a la descendencia de los afectos. Por lo tanto en las familias existe sólo uno o



**Figura 5. Utilización de las técnicas de proteómica en la identificación de causas de infertilidad.** Las proteínas presentes en muestras de espermatozoides de pacientes y de controles son extraídas y analizadas mediante técnicas de espectrometría de masas (izquierda). La identificación de proteínas con expresión incrementada o disminuida en pacientes permite entonces proseguir con el estudio de su función y con el análisis de los genes candidatos correspondientes.

pocos miembros afectados. Las alternativas son el estudio mutacional de genes candidatos o los estudios de asociación poblacional utilizando casos (pacientes infértiles) y controles (individuos fértiles). A través de esta estrategia existen ya evidencia de posible implicación como factor de riesgo de infertilidad en el varón en 23 genes candidatos (Tabla II; Krausz and Giachini, 2007).

En nuestro Grupo de Genética Humana hemos adoptado recientemente un nuevo enfoque encaminado a identificar genes candidatos y causas genéticas de infertilidad en el varón explotando la disponibilidad de herramientas de proteómica ((Figura 5). Nuestra hipótesis es que defectos en la composición proteica de los gametos presentes en semen son potencialmente responsables de una proporción importante de casos de infertilidad masculina que cursan con oligozoospermia, astenozoospermia o normozoospermia. En el pasado ya se había demostrado que alteraciones en el contenido de las protaminas, proteínas mayoritarias del núcleo del espermatozoide, estaban presentes en una proporción considerable de pacientes (de Yebra et al 1993; Mengual et al., 2003b; Torregrosa et al., 2006). Pero quedaba por determinar si alteraciones similares podrían encontrarse en proteínas menos abundantes presentes en el espermatozoide. Actualmente la utilización de técnicas de electroforesis bidimensional de proteínas, seguido de su aislamiento y análisis mediante espectrometría de masas permite identificar las proteínas potencialmente diferenciales presente en pacientes infértiles, a parte de contribuir a cubrir el vacío de conocimiento existente relativo a las proteínas presentes en espermatozoides humanos. Una vez identificada las proteínas diferencialmente expresadas es posible proceder a secuenciar los genes correspondientes en búsqueda de posible alteraciones o bien generar anticuerpos en vistas a su inmunolocalización y a su estudio en la espermatogénesis.

En una fase inicial de este proyecto conseguimos identificar las 98 proteínas más abundantes del espermatozoide humano (Martínez-Heredia et al., 2006). Muchas de estas proteínas nunca se había descrito que formase parte del espermatozoide. Entre las proteínas identificadas de función conocida ha resultado una sorpresa encontrar diversos factores de transcripción. Este hallazgo abre permite plantear la hipótesis de su posible función. El espermatozoide siempre se había descrito con la única función de transmitir el genoma paterno a la descendencia (Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 2006). Con

la identificación de factores de transcripción en el espermatozoide maduro se plantea la posibilidad de que ejerzan una posible función epigenética en las fases iniciales del desarrollo embrionario.

Actualmente estamos ya en una fase de identificar proteínas diferencialmente expresadas en pacientes infértiles en relación con controles (Figura 5). Esta línea de investigación ha dado lugar a la identificación de diversas proteínas implicadas en una disminución de la integridad germinal, de alteraciones de la relación de protaminas y de proteínas con expresión alterada en pacientes astenozoospermicos (de Mateo et al., 2007; Martínez-Heredia et al., 2007). Es previsible que este enfoque aporte pistas importantes para descubrir nuevas causas de infertilidad dado que la identificación de estas proteínas candidatas abre las puertas al estudio de los genes candidatos correspondientes en estudios de asociación casos - controles.

### Agradecimientos

Financiado por el proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia titulado “Proteómica del espermatozoide en pacientes infértiles, en modelos knock out y mecanismo de la transición nucleohistona nucleoprotamina” (referencia BFU2006-03479/BMC).

### Bibliografía

- Berta P, Morin D, Poulat F, Taviaux S, Lobaccaro JM, Sultan C, et al. Berta P, Morin D, Poulat F, Taviaux S, Lobaccaro JM, Sultan C, Dumas R. Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. *Nature* 1990;348:448-450.
- Casals T, Bassas L, Ruiz-Romero J, Chillon M, Gimenez J, Ramos MD, et al. Extensive analysis of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens: in 50% of cases only one CFTR allele could be detected. *Hum Genet.* 1995;95:205-211.
- de la Chapelle A. The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 1981;58:105-116.
- de Llanos M, Ballescà JL, Gázquez C, Margarit E, and Oliva R. High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates. *Human Reproduction* 2005;20:216-220.
- de Mateo S, Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Domínguez-Fandos D, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL and Oliva R. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 2007; in press.
- de Yebra, LI., Ballescà, J.L., Vanrell, J.A., Bassas, LI. and Oliva, R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:10553-10557.
- Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005; 42:209-213
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonad dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959; 1:711.
- Fraccaro M, Maraschio P, Pasquali F, Tiepolo L, Zuffardi O, Giarola A. Male infertility and 13-14 translocation. *Lancet.*1973;3;1(7801):488.
- Krausz C, Giachini C. Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl.* 2007;53:125-133.

- Larriba S, Bonache S, Sarquella J, Ramos MD, Gimenez J, Bassas L, Casals T. Molecular evaluation of CFTR sequence variants in male infertility of testicular origin. *Int J Androl.* 2005;28:284-290.
- Lynch M, Cram DS, Reilly A, O'Bryan MK, Baker HW, de Kretser DM, et al. The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2005;11:507-512.
- Margarit E, Coll MD, Oliva R, Gómez D, Soler A, Ballesta F. SRY gene transferred to the long arm of the X chromosome in a Y-positive XX true hermaphrodite. *American Journal of Medical Genetics* 2000;90:25-28.
- Margarit E, Soler A, Carrió A, Oliva R, Costa D, Vendrell T, et al. Molecular, cytogenetic and clinical characterization of six XX males including one prenatal diagnosis. *Journal of Medical Genetics* 1998;35:727-730.
- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Estanyol JM, Ballescà JL and Oliva R. Proteomic expression differences between asthenozoospermic and normozoospermic sperm samples. Submitted.
- Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL and Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 2006;6:4356-4369.
- Mengual L, Oriola J, Ascaso C, Ballescà JL, Oliva R An increased CAG repeat length in the androgen receptor gene in azoospermic ICSI candidates. *Journal of Andrology* 2003a;24:279-284.
- Mengual L, Ballescà JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and p1/p2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl.* 2003b;24:438-447.
- Oliva R, Ballescà JL. Valoración genética de la pareja estéril o infértil. En: Ballescà JL Editor. *Temas de actualidad en andrología I.* Barcelona: Asociación Española de Andrología. p. 61-92.
- Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clària J. *Genética Médica.* Barcelona: Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona; 2004.
- Oliva R, Margarit E, Ballescà JL, Carrió A, Sánchez A, Milà M, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in consecutive oligospermic and azoospermic ICSI candidates. *Fertility and Sterility* 1998;70:506-510.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;12:417-435.
- Oliva, R. and Dixon, G.H. Protamine genes and the histone to protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology* 1991;40:25-94.
- Oriola J, Pavia C. Unsuspected mutation in a family with congenital adrenal hyperplasia. *Am J Med Genet* 1997;71:249-250. Oriola J, Plensa I, Machuca I, Pavia C, Rivera-Fillat F. Rapid screening method for detecting mutations in the 21-hydroxylase gene. *Clin Chem* 1997;43:557-61
- Paracchini S, Stuppia L, Gatta V, Palka G, Moro E, Foresta C, Mengual L, Ballescà JL, Oliva R, et al. Y-chromosomal DNA haplotypes in infertile European males carrying Y-microdeletions. *Journal of Endocrinological Investigation* 2000;23:671-676.
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995;10:383-393.
- Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet.* 2003; 35:247-251.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976;34:119-124.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R Protamine 2 (P2) precursors, P1/P2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod.* 2006;21:2084-2089.
- White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:5111-5115.



# Vitrolife

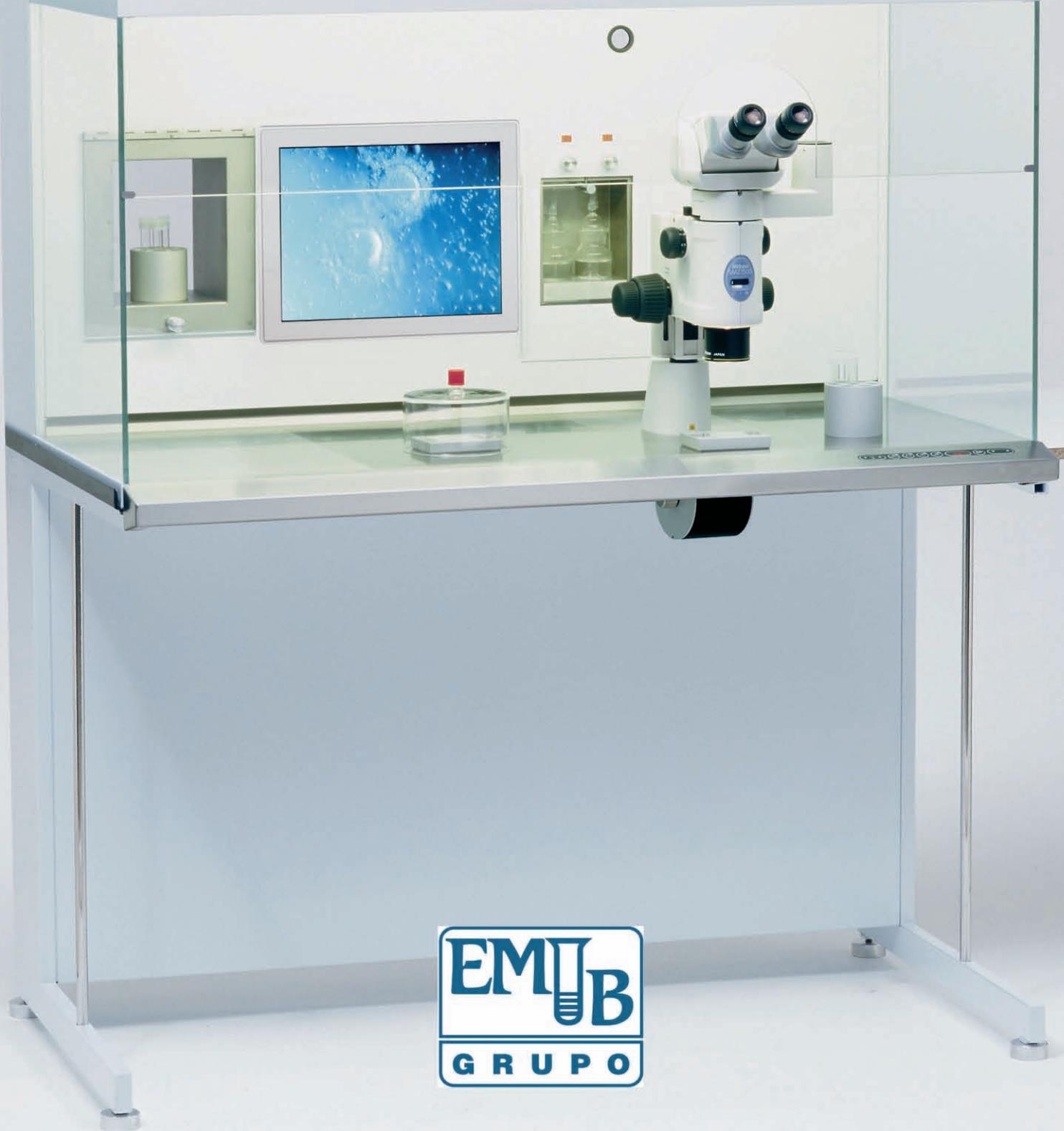


Innovative Cell and Tissue Technology





WF Workstation L224



## MÉTODOS ANTICONCEPTIVOS Y FERTILIDAD POSTERIOR

Ezequiel F. Pérez Campos

Servicio de Ginecología del Hospital General de Requena, Valencia. Correo electrónico: [eperezc@sego.es](mailto:eperezc@sego.es)

Los métodos anticonceptivos tienen como objetivo el permitir el libre ejercicio de la actividad humana de la sexualidad separada del hecho de la procreación. Pretenden, por tanto, que las mujeres y sus parejas puedan decidir libremente el momento de la procreación. Y, consecuentemente, además de su eficacia, seguridad y comodidad de uso, deberán analizar también entre sus propiedades la posibilidad de la fertilidad posterior, la posible pérdida o retraso en el restablecimiento de la misma o, en su caso, la pérdida definitiva de dicha fertilidad.

Cuando intentamos establecer la influencia de los distintos métodos anticonceptivos en la fertilidad posterior, encontramos varias dificultades (Doval and Martínez, 2007)

Conocer las condiciones de fertilidad previas a su uso

Aislar la influencia de cada método, si se ha usado más de uno

El tiempo hasta embarazo (THE) sólo puede ser medido en caso de embarazos planificados y los estudios de cohortes resultan dificultosos por la gran cantidad de variables que pueden interferir

La edad de la mujer es un factor determinante de la fertilidad

Sabemos más recientemente, que la edad del hombre también puede influir; tras el ajuste por otros factores; la probabilidad de se precisen más de 12 meses en conseguir un embarazo en una pareja van desde un 8% cuando el varón tiene menos de 25 años, hasta el 15% si tiene más de 35 años (Ford et al., 2000).

Otros factores del estilo de vida relacionados con el descenso de la fertilidad son el peso de la mujer, consumo de tabaco por ella o la pareja, consumo de alcohol por la pareja, paridad, patrón menstrual, ejercicio físico extremo, exceso de cafeína, drogas, turnos en el trabajo y jornadas laborales prolongadas, tanto en la mujer como en el hombre (Hassan and Killick, 2004)

Entre las múltiples clasificaciones que de los métodos anticonceptivos podemos realizar, se encuentra aquella en la que se dividen en **reversibles o irreversibles**, en función de la posibilidad o no de recuperación de la fertilidad al cesar su uso. Los métodos irreversibles son los que no permiten la recuperación de la fertilidad posterior o lo permiten con mecanismos complejos.

Entre los **métodos** considerados como **no reversibles** se encuentran las distintas técnicas de bloqueo tubárico y la vasectomía. Si bien, en la mayoría de los casos se puede intentar la reversibilidad con técnicas quirúrgicas de restablecimiento de la integridad de la luz de la trompa o del conducto deferente.

El único método que no reconoce sistema de reversibilidad es el bloqueo tubárico trans-histeroscópico con el dispositivo *Essure* que queda anclado en la porción intrauterina de la trompa provocando una intensa reacción fibrosa local que, hasta la fecha, no reconoce la reversibilidad y en la que tampoco están aconsejadas las técnicas de reproducción asistida, última opción en caso de no conseguir el funcionalismo de la trompa o el deferente afectado por una técnica quirúrgica.

Los métodos que seccionan trompa o deferente, pueden revertirse con una nueva intervención sobre dichos conductos mediante técnicas de macro o de microcirugía (Lertxundi, 2000). En el caso de la vasectomía, el éxito será mayor a más precocidad de la reintervención y a menos agresividad de la técnica inicial. Cuanto mayor sea la cantidad de conducto deferente reseca, más comprometido está el éxito posterior de la vaso-vasostomía o re-anastomosis. Igualmente, los intentos de recanalización pasados 10 años desde la intervención inicial, se acompañan de resultados muy pobres. La tasa de éxitos de la vaso-vasostomía se encuentra en un 80% de eyaculados positivos y un 60% de gestaciones; si éstas no se producen en los 2-3 primeros meses, las posibilidades de éxito se reducen drásticamente (Lertxundi, 2000).

Los intentos de aspiración de semen del epidídimo mediante criocirugía, extracción/aspiración del semen del testículo y posterior ICSI pueden proporcionar una tasa de embarazo entre el 19,5 y 22,5%. Dado el coste de este tratamiento y sus posibles complicaciones, algunos autores consideran que deben restringirse a los fracasos en la re-permeabilización (Jequier, 1998). La mejor prevención consiste en un adecuado asesoramiento previo y en aconsejar la criopreservación espermática antes de la vasectomía (Doval and Martínez, 2007)

En cuanto al bloqueo de las trompas, además de lo señalado para el sistema *Essure*, existen una serie de técnicas, hoy en desuso por su menor eficacia y complejidad técnica (anillos de Noon, clips de Hulka, etc.) que permitían la reversibilidad al retirar el dispositivo que bloqueaba transitoriamente la trompa, por vía laparoscópica. Como sucede con la esterilización masculina, también es mayor cada vez el número de mujeres que solicitan reversibilidad de su ligadura tubárica para gestar de nuevo. Las técnicas de microcirugía permiten obtener tasas de gestación relativamente satisfactorias tras la recanalización, aunque el problema es el aumento en la tasa de embarazo tubárico. También la mayor o menor porción de trompa eliminada o electrocoagulada será determinante en el éxito de la recanalización (Doval and Martínez, 2007). Con técnicas de microcirugía en laparotomía o laparoscopia se consigue una tasa de embarazo de 83,3% a los 18 meses y una tasa de embarazo ectópico de 3,2% (Yoon et al., 1999).

En presencia de factores de esterilidad asociados, que siempre deben valorarse y estudiarse, como la disminución de la reserva ovárica o el factor masculino, se debiera aconsejar la fertilización *in vitro* (FIV). Cuando no haya factores de esterilidad asociados, la mujer tenga menos de 41 años y se domine la técnica quirúrgica adecuadamente, se puede intentar la re-permeabilización de las trompas (Coroleu, 2001)

Todos los demás métodos anticonceptivos, se consideran como reversibles y la recuperación de la fertilidad será más o menos rápida y total tras su suspensión:

**1.- Métodos naturales:** evidentemente, los métodos que únicamente modifican las condiciones naturales del coito para evitar que este sea fecundante, permitirán la reversibilidad y fertilidad en cuanto se modifiquen las condiciones del control. Entre estos métodos están los de la abstinencia periódica (Ogino-Knauss, temperatura basal, moco cervical o Billings y sintotérmico) y el coito interrumpido. En ellos la fertilidad de la mujer no está interrumpida sino que se modifican las condiciones para evitar que el coito se realice en los momentos fértiles o se interrumpe la llegada de espermatozoides al cérvix uterino.

También como natural se considera el método de la lactancia-amenorrea (MELA), de mayor eficacia que los anteriores bajo unas estrictas condiciones de uso, y que permitirá igualmente el restablecimiento de la fertilidad con la recuperación de la ovulación entre dos y seis semanas tras la suspensión de la lactancia. Incluso, cuando la lactancia se alarga más de seis meses, si no es completa o se presentan sangrados, existen muchas posibilidades de fallo del método por recuperación espontánea de la fertilidad.

**2.- Métodos de barrera:** en el caso del preservativo masculino o femenino, el diafragma, las esponjas vaginales o capuchones cervicales, así como con las sustancias espermicidas, tampoco existe una modificación de las condiciones de fertilidad de la mujer, sino la instauración de una barrera artificial entre óvulo y espermatozoides. Basta la supresión de esta barrera para que las condiciones previas de fertilidad, o las que correspondan simplemente por otras características del varón o la mujer (edad, condiciones de patología, etc.) sean restablecidas.

**3.- Los métodos hormonales combinados (AHC)** (píldora, inyectable, anillo o parche dérmico), permiten, en líneas generales, el restablecimiento de la fertilidad previa o la que corresponda por la edad de la mujer tras su suspensión. La recuperación de la fertilidad se produce, además en un breve plazo.

Hemos de decir que los datos disponibles respecto a la píldora son abrumadoramente más abundantes que sobre las otras vías de administración, aunque la superposición de su mecanismo de acción y resto de características, nos permiten interpolar los resultados, que vienen, además, siendo corroborados por nuevos datos de la literatura.

Es muy importante señalar que la disminución de la fertilidad observada después de largos períodos de utilización de la píldora tiene que ver en muchos casos con dificultades preexistentes no testadas por utilización precoz de la píldora para evitar embarazos en mujeres nuligestas y, desde luego, con la disminución fisiológica de la fertilidad que lleva aparejada la edad, como bien sabemos por el uso y el diferente éxito de las técnicas de reproducción asistida en función de la edad de las mujeres.

En estudios iniciales, se observó un retraso de 3-6 meses en la concepción tras uso de la píldora. Un gran estudio prospectivo de la Asociación de Planificación Familiar de Oxford indicó que el uso

prolongado de AHO puede retrasar más la concepción entre las mujeres mayores que entre las más jóvenes (Vessey et al., 1986). Otros estudios redundan en los mismos hallazgos relacionados con la edad. Los preparados usados en dichos estudios contenían más de 35 mcg de etinilestradiol, preparados ya en desuso por la disminución de las dosis hormonales en las píldoras actuales. Los estudios más recientes son igualmente tranquilizadores al respecto (Farrow et al., 2002).

Hassan en 2004 (Hassan and Killick, 2004) señalan un THE tres meses más largo en usuarias de AHC orales e inyectables frente a usuarias de preservativo, si bien este efecto era más notable en mujeres de mayor edad, con sobrepeso o trastornos menstruales, es decir, con función ovárica comprometida. Los mismos autores señalan que el efecto es transitorio y despreciable.

En cuanto a la posibilidad de aparición del síndrome de amenorrea post-píldora, éste no parece relacionarse con ningún componente concreto, ni con el tiempo de toma ni con la dosis y puede ser presentado tanto por las mujeres con amenorrea previa como por las bien regladas. Su incidencia es menor del 1% (Doval and Martínez, 2007).

No se ha encontrado relación causal entre uso de AHC y aparición de adenomas hipofisarios (*Pituitary Adenomas Study Group*, 1983). Las pacientes que usaron AHC para corregir trastornos menstruales tenían más posibilidades de presentar adenomas que las usuarias sólo por anticoncepción, indicando la posible presencia de un adenoma previo no diagnosticado.

Se ha observado una reducción de la tasa de aborto espontáneo entre antiguas usuarias de AHO mayores de 30 años; la explicación puede ser la protección frente al aborto por aneuploidía en mujeres que han preservado el número de folículos por el anovulatorio (Ford and Macormac, 1995).

En AHC inyectable, la fertilidad se restaura al mes siguiente y el retorno a la fertilidad es superponible al DIU (Bahamondes et al., 1997).

También los nuevos métodos de administración estacional o continuada permiten un rápido regreso a la fertilidad y a la ovulación. En el caso de la píldora de administración continuada próxima a comercializarse en España (20 mg de etinilestradiol y 90 mg de levonorgestrel), el retorno de la ovulación es en una media de 15,6 días y el 100% de los casos han ovulado en un mes (Archer et al., 2006). La menstruación se presenta en 30 días en un 38%, en 60 en un 92,5% y el 99% ha menstruado en el plazo de 90 días (Davis et al., 2005).

**4.-** En cuanto a los **métodos hormonales con sólo gestágeno** (inyectables de acetato de medroxi-progesterona depot –AMPD-, píldora de sólo gestágeno –PSG-, e implantes subcutáneos), todos permiten una recuperación de la fertilidad posterior aunque con plazos variables. Si en el caso de la PSG y los implantes, los niveles hormonales exógenos disminuyen drásticamente en pocas horas y se restablece el ciclo ovulatorio con rapidez, en el caso del AMPD, la recuperación de la ovulación, la menstruación y la fertilidad puede verse retrasada a veces hasta seis meses o un año. Por esa razón no es el método aconsejable cuando se desee un rápido regreso a una situación de fertilidad. Tras la última

inyección, la ovulación se suele recuperar a los 200 días. La regla tarda unos 5,8 meses como media y la gestación se retrasa entre 3 y 21 meses (media, 9,3 meses) El tiempo para recuperar la fertilidad no aumenta con el tiempo de uso (Kora and Wirkar, 1975).

Los implantes subdérmicos de gestágenos (etonogestrel o levonorgestrel –LNG-) presentan, tras su extracción, una rápida desaparición de niveles sanguíneos de hormona, indetectables a los pocos días de la extracción por lo que la recuperación de la fertilidad se considera inmediata. Se ha detectado, con niveles hormonales en sangre y seguimiento ecográfico, la ovulación a la tercera semana de la extracción. El embarazo se ha publicado en el 60% de usuarias a los seis meses de la extracción y en el 80% al año (Darney, 2000)

**5.- Dispositivos intrauterinos (DIU):** los hay actualmente de dos tipos, ambos con gran eficacia y seguridad, siempre que no exista riesgo de infecciones de transmisión sexual, en cuyo caso no están recomendados.

Tanto los liberadores de iones de cobre como los liberadores de levonorgestrel (éstos últimos combinan la anticoncepción intrauterina con la del gestágeno) permiten una rápido regreso a la fertilidad.

En el caso de los DIUs de cobre, la ovulación no se ha visto modificada y ha sido otro su mecanismo de acción a través de la interferencia en la capacitación espermática o la maduración endometrial. Cuando desaparece el elemento causante de dichas acciones, se recuperan las condiciones de fertilidad pre-existentes.

En el caso del sistema liberador de LNG, el espesamiento del moco cervical y la posible anovulación que aparece en un 25% de los casos, se recupera igualmente en breve plazo tras la retirada del dispositivo.

La salpingitis aguda predispone a la mujer a padecer esterilidad, principalmente por obstrucción de las trompas de Falopio. Los primeros estudios con usuarias de DIU mostraron un aumento de la esterilidad, aunque no se controlaba detalles tan trascendentes como el número de parejas sexuales, que es un factor de riesgo para salpingitis y esterilidad subsecuente, motivada por las ITS y no por el DIU (Wilson, 1989). Igualmente, el riesgo de enfermedad inflamatoria pélvica asociado a inserción de DIU se limita al primer mes tras el procedimiento (OMS, 1992).

El uso actual de un DIU moderno comporta poco riesgo de EIP para las mujeres con bajo riesgo de ITS. Por tanto, ni el DIU de cobre ni el liberador de LNG influyen en la fertilidad posterior, ni lo hace la duración de su uso (Doval and Martínez, 2007).

La polémica sobre el uso de DIU en mujeres nulíparas presenta numerosas evidencias de que no se asocia a un mayor riesgo de infertilidad posterior (Conferencia de consenso de la SEC, 2000); el uso del DIU no se asoció a un mayor riesgo de obstrucción tubárica en mujeres nulíparas; la presencia de anticuerpos frente a la Chlamydia, por el contrario, sí (Hubacher, 2001).

En cuanto a las mujeres con embarazo ectópico y DIU, globalmente la fertilidad fue significativa-

mente mayor. La recurrencia de ectópico en portadoras de DIU es rara y la tasa de embarazo intra-uterino es similar a las de no usuarias de DIU (Bernoux et al., 2000).

Podemos por tanto concluir que los métodos anticonceptivos modernos de los que las parejas pueden disponer para el desarrollo de una sexualidad libre y para aumentar su nivel de salud, presentan, en líneas generales, una muy buena situación en cuanto a la posible recuperación de la fertilidad, salvo en aquellos que en su planteamiento ya cuentan con su carácter de métodos definitivos o el AMPD, que puede resultar más lento en el proceso de restablecimiento de la fertilidad. Los DIUs no deben usarse en mujeres con riesgo incrementado de ITS y EIP, para evitar problemas de fertilidad posterior. De esta forma, fertilidad deseada y anticoncepción demandada establecen un binomio con escasas interferencias y buenas relaciones.

### Bibliografía

Archer, DF et al. Abstract en 61rd Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine; 2005.

Bahamondes L, Lavin P, Ojeda J, Petta C, Diaz J, Maradiegue E et al. Return of fertility alter discontinuation of de once-a-month injectable contraceptive Cyclofem. *Contraception* 1997; 55:307-10.

Bernoux A, Job-Spira N, Germain E, Coste J, Bouyer J. Fertility outcome after ectopic pregnancy and use of an intrauterine device at the time of the index ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 2000; 15:1173-7.

Coroleu V. Fertilidad después de la esterilización tubárica. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*, 2001.

Darney PD, Implantable contraception. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2000; 5 Suppl 2:2-11.

Davis AR et al. Abstract en 54th Annual Clinical Meeting of American College of Obstetricians and Gynecologists ; 2006.

Doval JL, Martínez F. Contracepción y fertilidad posterior. En: Matorras R, Hernández J. Estudio y tratamiento de la pareja estéril. Madrid: Ed Adalia; 2007.

Farrow A, Hull MG, Northstone K, Taylor H, Ford WC, Holding J. Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPEC Study Team (AVON Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod* 2002; 17:2754-61.

Ford JH, MacCormac L. Pregnancy and lifestyle study: the long-term use of the contraceptive pill and the risk of age-related miscarriage. *Hum Reprod* 1995; 10:1397-402.

Ford WC North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (AVON Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod* 2000; 15:1703-8.

Hassan MA, Killick SR. Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* 2004; 81:384-92.

Hubacher D, Lara-Ricalde R, Taylor DJ, Guerra-Infante F, Guzmán-Rodríguez R. Use of copper intrauterine devices and the risk of tubal infertility among nuligravid women. *N Engl J Med* 2001; 345:561-7.

Jequier AM. Vasectomy related infertility: a major and costly medical problem. *Hum Reprod* 1998; 13:1759-60.

Kora S, Wirkar K. Incidence of pregnancy, changes in menstrual pattern, and recovery of endometrial function after discontinuation of medroxyprogesterone acetate therapy. *Fertil Steril* 1975; 26:121-5.  
Lertxundi R, Lete I. Anticoncepción quirúrgica: vasectomía. En: Lete, I. Manual del curso de habilidades en anticoncepción. Madrid: Ed SEC. 1999. p. 135-43.

Pituitary adenomas and oral contraceptives: a multicenter case-control study. Pituitary Adenomas Study Group. *Fertil Steril* 1983; 249:2204-7.

Sociedad Española de Contracepción. Conferencia de consenso sobre manejo clínico de la anticoncepción intrauterina. Madrid: Ed. SEC; 2001.

Vessey MP, Smith MA, Yeates D, Return of fertility after discontinuation of oral contraceptives: influence of age and parity. *Br J Fam Plann* 1986; 11:120-4.

Wilson JC. A prospective New Zealand study of fertility after removal of copper intrauterine contraceptive devices for conception and because of complications: a four year study. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 160:391-6.

Yoon TK, Sung HR, Kang HG, Cha SH, Lee CN, Cha KY. Laparoscopic tubal anastomosis: fertility outcome in 202 cases. *Fertil Steril* 1999; 72:1121-6.

## REGISTRO DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD: AÑO 2004

José A. Castilla, Yolanda Cabello, Javier Marqueta, Juana Hernández, Buenaventura Coroleu

Registro TRA, Sociedad Española de Fertilidad. Correo electrónico: josea.castilla.sspa@juntadeandalucia.es

### Introducción

Dentro de los objetivos de la SEF se encuentra, “el seguimiento en España de la utilización de las técnicas de reproducción asistida (TRA)”. Con este propósito, en el año 1993 comienza a funcionar el Registro de TRA SEF, con la intención de proporcionar una información global de las TRA, que permitiera conocer el número de tratamientos realizados y sus características demográficas y médicas. Permitiendo una continua actualización de los protocolos de diagnóstico y tratamiento, y proporcionando a los usuarios una información veraz y actualizada de las actividades clínicas en los diferentes centros.

Sus resultados son publicados desde el año 1993 y hasta el año 1998 en el Boletín de la SEF, y a partir de ese año hasta la actualidad en la Revista Iberoamericana de Fertilidad (acceso a todos los informes anuales en [http://nuevo.sefertilidad.com/charts/centros\\_old.php](http://nuevo.sefertilidad.com/charts/centros_old.php)).

El Registro TRA SEF participó en la creación del *European IVF Monitoring Consortium* (EIM) en 1997, responsable del Registro Europeo de TRA (acceso a todos los informes anuales en <http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=496>), además de participar en el registro mundial de TRA, en sus inicios denominado *Internacional Working Group for Registers on Assisted Reproduction* (IWGROAR), y desde 2001 denominado como *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology* (ICMART).

### Organización del Registro TRA SEF

El Registro TRA SEF se compone de un coordinador y 4 vocales, actualmente 2 de ellos embriólogos. Cada año se distribuye entre los Socios de la SEF el formulario del registro y se solicita su participación de manera voluntaria. Desde el año 2002 el registro SEF se realiza de forma electrónica a través de una empresa de *consulting*.

Una vez finalizado el periodo de recogida de datos estos son procesados y analizados estadísticamente de forma anónima y se elabora un informe con formato de revista que es repartida a todos los centros y servicios que realizan reproducción asistida y son también expuestos con carácter público en la página Web de la SEF. Los resultados son presentados en el congreso bianual de la SEF, y en el de otras Sociedades Científicas afines (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, ASEBIR) Las técnicas de reproducción asistida objeto del Registro TRA SEF:

Inseminación Artificial Conyugal (IAC)  
Inseminación Artificial con Semen de Donante (IAD)  
Fecundación *in vitro* (FIV)

Microinseminación espermática (ICSI)  
 Crioconservación embrionaria  
 Donación de ovocitos  
 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)  
 Parejas con enfermedades infecciosas transmisibles

Las variables principales analizadas abarcan diferentes aspectos:

Nivel de Actividad  
 Parámetros clínicos: Edad media de las mujeres, Causa de la esterilidad y Pauta de tratamiento  
 Eficacia: Tasa de embarazo  
 Calidad: Número de embriones transferidos  
 Seguridad y riesgos: Embarazos múltiples, complicaciones (Síndrome de hiperestimulación, etc)

### Evolución del número de centros participantes y actividad registrada

Desde sus comienzos el Registro TRA SEF ha tenido un carácter voluntario. No obstante, el número de centros participantes ha ido aumentando desde 8 centros en el año 1993 hasta 116 en el 2004 (Fig. 1). Este último dato supone el 64% de todos los centros acreditados en nuestro país para TRA.

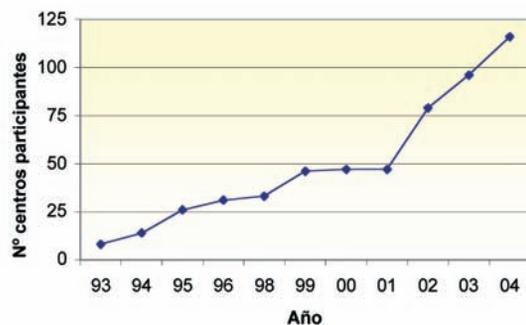


Fig.1. Evolución del número de centros participantes en el Registro TRA SEF

A lo largo de su existencia el registro TRA SEF ha contabilizado 261.595 ciclos de TRA. Los ciclos de TRA registrados han ido creciendo a lo largo de los años, tanto para ciclos de Inseminación artificial conyugal y de donante, como de FIV/ICSI, Donación de ovocitos, y DGP. En el año 2004 se registraron 27.481 ciclos de FIV/ICSI, 5.242 criotransferencias, 4.801 recepción de ovocitos y 1.362 ciclos de DGP. Que hace un total de 38.886 ciclos de FIV/ICSI y técnicas afines (Fig. 2). De IAC 24.329 ciclos y de IAD 4.862 ciclos.

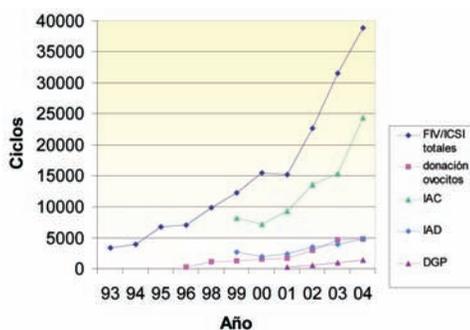


Fig.2. Ciclos analizados en el Registro TRA SEF según técnica

El porcentaje de criotransferencias respecto al número de ciclos FIV/ICSI realizado es superior en el registro europeo que en el español (26% versus 19%), lo que sugiere diferencias en los criterios de crio-

conservación de embriones. En comparación con el registro europeo de todas las técnicas afines a FIV/ICSI en España se realiza un mayor porcentaje de donación de ovocitos y DGP, lo que supone que casi uno de cada dos ciclos de donación de ovocitos y de DGP registrados en Europa se realiza en España.

Se han registrado 442 ciclos de inseminación artificial y 210 ciclos de FIV/ICSI en parejas serodiscordantes. En estos últimos la técnica más utilizada de inseminación fue la ICSI en un 96,7% de los casos.

### Parámetros clínicos

El porcentaje de pacientes <35 años tratadas con FIV/ICSI fue 54,6% en 2004 frente al 50,9% y 50,8% en 2002 y 2003 respectivamente. Un incremento similar se observa en la edad de mujeres receptoras de ovocitos. La indicación más frecuente de FIV/ICSI fue el factor masculino en 2004 (36,2%) frente al 30,7 y 30,8 en 2002 y 2003 respectivamente. Este incremento se produjo a costa de una reducción de indicaciones por factor femenino/tubárico.

El porcentaje de ciclos con antagonistas ha seguido incrementándose alcanzando ya el 34,5% de todos los ciclos de FIV/ICSI. Igualmente, la utilización de ICSI sigue aumentando llegando al 71,8% en los ciclos de FIV/ICSI realizados. Una tendencia similar se observa en el registro europeo pero no tan acentuada ya que en dicho registro el 59% de los ciclos fueron de ICSI en 2004.

Accesibilidad: con las limitaciones de un registro voluntario, hemos estimado que en España se realizaron 884 ciclos de FIV/ICSI y técnicas afines por millón de habitantes. Y los nacidos por estas técnicas en 2004 representaron el 1,6% de todos los recién nacidos en España en 2004.

### Eficacia: Tasa de embarazo

La tasa de embarazo por transferencia ha seguido la tendencia alcista de los últimos años llegando a un 40% en FIV, 36,7% en ICSI, 27,5% en criotransferencias y un 51,9% en donación de ovocitos. Todas ellas muy superiores a la media europea de 2004. Sin embargo llama la atención que el porcentaje de embarazos por ciclo y punción siga disminuyendo desde 2002. Esto puede relacionarse con el incremento en la edad de las pacientes atendidas. Estas cifras sitúan a España en los puestos de cabeza del registro europeo en tasas de embarazo.

### Calidad de TRA

La evolución en el número de embriones transferidos entre los años 1998 y 2004 demuestra que se ha producido un descenso continuo en las transferencias de más de 3 embriones, éste descenso se ha suavizado en los dos últimos años. Las transferencias de 3 embriones en 2004 han caído hasta situarse en valores inferiores a los del año 2000. Este descenso se ha visto compensado con la subida de las transferencias de 2 embriones, que ha ido aumentando claramente desde 1998. La transferencia de un solo embrión ha ido aumentando paulatinamente aunque lentamente (Fig. 3).

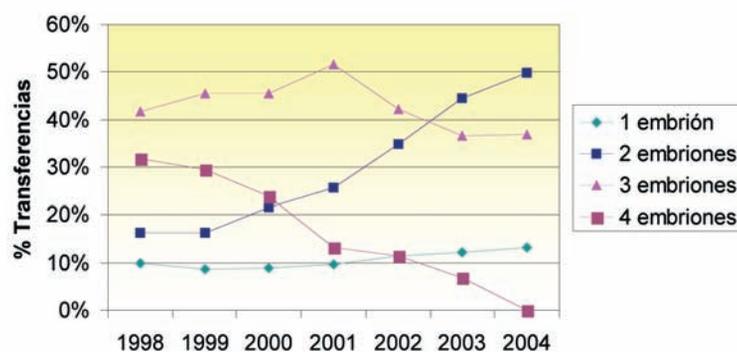


Fig 3. Evolución de la política del número de embriones a transferir

Este cambio en la política de transferencia ha hecho que el número de embriones transferidos por cada embarazo sea similar en el registro europeo que en el español (7 embriones transferidos/embarazo), hecho que en el año 1999 era 7,8 en el registro europeo frente a 10,2 en el registro español.

### Seguridad de TRA

En la evolución de la multiplicidad de los partos se observa un aumento de los partos únicos, a la vez que los partos múltiples experimentan una leve disminución en todas sus modalidades, dobles, triples, cuádruples o más (Fig. 4). Reflejo del cambio de política en la transferencia embrionaria comentado anteriormente. A pesar de esta reducción en parto múltiples, los porcentajes de embarazo múltiple del registro español son superiores a la media europea (26,9% *versus* 22,7%) en 2004. El porcentaje de Síndrome de hiperestimulación fue similar en el registro europeo que en español (0,9% *versus* 0,7%)

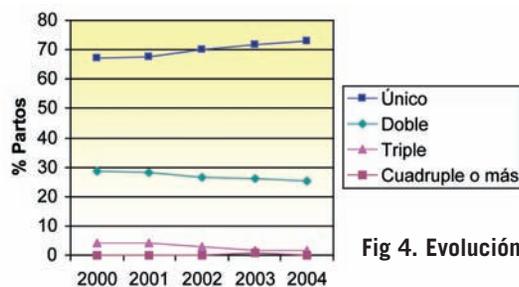


Fig 4. Evolución de la multiplicidad de los partos

### Inseminación Artificial

De los 29 países que participan en el registro europeo solo 19 aportan datos sobre IA, siendo España uno de ellos. Como ya se comentó en España en 2004 se realizaron de IAC 24.329 ciclos y de IAD 4.862 ciclos. La tasa de embarazos global (14,9% *versus* 13,2%) fue superior en todos los rangos de edad a la media del registro europeo. La tasa de embarazo múltiple fue en IAC del 13,6% y en IAD 14%, lo que supone una tasa de embarazo múltiple en IA del 13,7% frente al 12% del registro europeo. Como vemos la tasa de embarazo múltiple tras IA fue la mitad que tras IVF/ICSI (13,7% *versus* 26,9%)

### Conclusiones

El registro TRA SEF se va consolidando año tras año gracias al incremento en la participación voluntaria de los centros de reproducción asistida, lo que sitúa a España en el grupo de cabeza de países de Europa con mayor número de ciclos de TRA registrados. Gracias al registro TRA SEF se pudo comprobar que España presentaba a finales de la década pasada un elevado número de embarazos múltiples por TRA, lo que permitió cambiar la política de transferencia de embriones, y constatar mediante el registro TRA SEF la eficacia de este cambio.

Entre los nuevos retos que se presentan al Registro TRA SEF se encuentra el aumentar el porcentaje de participación, el registro del llamado "turismo reproductivo", el registro y seguimiento de los partos y recién nacidos por TRA y la colaboración con las autoridades sanitarias para el desarrollo del registro de actividad previsto en la legislación vigente.

### Agradecimientos

El registro TRA de la SEF quiere agradecer a Organon Española S.A. su ayuda técnica.

# EVOLUCIÓN DE LA PROTECCIÓN DEL EMBRIÓN EN LA NORMATIVA ESPAÑOLA: DE LA LEY DE REPRODUCCIÓN DE 1988 A LA CLONACIÓN TERAPÉUTICA

Fernando Abellán

Derecho Sanitario Asesores. Correo electrónico: fernando.abellan@derechosanitarioasesores.com

## Introducción

En estas líneas se pretende llevar a cabo un análisis sobre el estatuto jurídico del embrión, tanto *in vitro* como implantado en el útero, teniendo como punto de llegada del estudio la ley de 2006 sobre técnicas de reproducción humana asistida<sup>i</sup> y la ley de investigación biomédica de 2007<sup>ii</sup>. Para ello, deseo partir de la situación anterior a las normas citadas, concretamente en la que se derivaba de la originaria ley de reproducción de 1988 y de su reforma posterior operada en 2003. De esta manera, podremos apreciar cómo ha evolucionado en España la consideración legal del embrión humano en los últimos años.

A la postre, la respuesta de los textos legales a preguntas del tipo ¿qué intervenciones diagnósticas o terapéuticas pueden realizarse sobre el embrión?, ¿qué límites existen a la generación de embriones?, ¿qué destinos posibles se ofrecen a los progenitores respecto de los embriones sobrantes congelados?, ¿cuándo puede destruirse sin más un embrión?, son las que verdaderamente definirán la consideración que en cada momento tiene el Derecho sobre esta realidad biológica tan controvertida.

Una primera medida de protección genérica, que se mantiene desde el inicio de la regulación de las técnicas de reproducción asistida, la encontramos en la distinción que realiza el mundo del Derecho entre los términos preembrión y embrión. El primero se refiere al embrión preimplantatorio y consiste en el embrión *in vitro* constituido por el grupo de células resultantes de la división progresiva del ovocito desde que es fecundado hasta catorce (14) días más tarde<sup>iii</sup>. El segundo se corresponde con el embrión postimplantatorio y abarcaría la fase de desarrollo embrionario desde el momento en que el ovocito fecundado se encuentra en el útero de una mujer hasta que se produce el inicio de la organogénesis<sup>iv</sup>.

Así, cuando se habla de preembrión las normas permiten más actuaciones que cuando nos referimos al embrión propiamente dicho. En efecto, por ejemplo, de acuerdo con la legislación vigente al preembrión se le puede donar a otras parejas o donar para la investigación, e incluso descongelar sin más. Por el contrario, al tratar del embrión el escenario que se plantea descarta las posibilidades anteriores y tan sólo se contemplan hostilidades para el mismo en situaciones excepcionales como la reducción embrionaria en caso de necesidad terapéutica, o el aborto legal si el estadio es más avanzado y siempre dentro de los supuestos permitidos en el Código Penal (aborto terapéutico, ético y

eugenésico, respectivamente)<sup>v</sup>.

No obstante lo anterior, en este trabajo no utilizaremos esta terminología de preembrión-embrión, sino que se utilizará el término embrión para ambos supuestos, salvo cuando haya de matizarse separadamente la situación «in vitro» y la posterior a la anidación.

En cualquier caso, y como criterio valorativo de partida, la propuesta sería la de reconocer que el nivel de protección del embrión será más importante cuando las normas favorezcan más claramente su destino reproductivo y limiten su generación de acuerdo con el proyecto familiar de la pareja o mujer de la que procedan. Por el contrario, el nivel de protección será menor cuando se puedan generar sin control o se permita decidir directamente sobre opciones que conlleven su inevitable destrucción, bien directamente bien por emplearse en la investigación.

## 2. La protección del embrión bajo la ley de reproducción de 1988 (1988-2003)

La ley de reproducción asistida de 1988<sup>vi</sup>, una de las más permisivas de su época en el ámbito europeo, tuvo una vigencia muy prolongada en el tiempo (18 años), lo que es un indicio de que el marco jurídico que estableció fue lo suficientemente amplio y flexible para aguantar durante largo tiempo los avances de la ciencia y las demandas sociales relacionadas con la medicina reproductiva.

Además, la ley de 1988 fue supervisada, y validada en su práctica totalidad, nada menos que por el Tribunal Constitucional, con motivo del recurso de inconstitucionalidad que contra la misma se formuló en su día. Las consideraciones de este tribunal son muy relevantes también en el asunto que nos ocupa y de ellas trataremos más adelante.

Hay que comenzar diciendo que en uno de sus primeros artículos, la ley de 1988 proclamaba de forma taxativa la prohibición de fecundar óvulos humanos con cualquier fin distinto a la procreación humana<sup>vii</sup>. Al mismo tiempo, no aceptaba ninguna intervención sobre el embrión *in vitro* con fines diagnósticos que no fuera dirigida a valorar su viabilidad o la detección de enfermedades hereditarias, con el fin de tratarlas si fuera posible, o de desaconsejar su transferencia si no existía tratamiento; y en el caso del embrión en el útero y del feto, sólo podía ser legítima si tenía por objeto el bienestar del *nasciturus*<sup>viii</sup> y el favorecimiento de su desarrollo, todo ello bajo una serie de condiciones legales<sup>ix</sup>. Y, por último, no se permitía tampoco la investigación con embriones congelados sobrantes de las técnicas de reproducción asistida, salvo que fueran no viables biológicamente.

Por lo que se refiere a la posibilidad de destrucción o descongelación de estos embriones sobrantes, sólo se contemplaba indirectamente como consecuencia de la superación del plazo máximo de conservación, fijado entonces en cinco años, pero no como una opción libre a favor de los progenitores o de los centros, sino como salida en principio inevitable para unos embriones que ya no podían

destinarse a la reproducción, al existir dudas sobre los efectos de la congelación más allá de los citados cinco años<sup>X</sup>. A pesar de ello, sabemos que muchos centros se resistieron a descongelar después de transcurrido ese tiempo, lo que dio lugar al almacenamiento de un gran número de embriones congelados sin un destino claro.

De hecho, la única alternativa de decisión para las parejas respecto de sus embriones sobrantes viables era la de utilizarlos para su propio proyecto reproductivo, o la de donarlos altruistamente a otras parejas que lo necesitaran también con fines de reproducción<sup>XI</sup>.

En resumen, el legislador de 1988, abogó a ultranza por el destino reproductivo de los embriones viables, sin dotar a los progenitores de otras opciones distintas que les permitieran decidir el destino de aquéllos; así como por autorizar únicamente intervenciones diagnósticas o terapéuticas en beneficio del propio embrión viable; y sin contemplar en ningún caso la descongelación o destrucción como una posibilidad elegible.

### 3. La doctrina del Tribunal Constitucional sobre la protección del embrión (1996-1999)

La doctrina del Tribunal Constitucional sobre la materia emana fundamentalmente, como ya se ha dicho más arriba, de la impugnación que se realizó en su día de la derogada ley de reproducción asistida de 1988<sup>XII</sup>, pero también de la ley de embriones del mismo año<sup>XIII</sup>.

Se ha comentado igualmente que en la ley de 1988 se consideraba legal la intervención en el embrión dentro del útero y en el feto, con fines diagnósticos, siempre que la misma tuviera por objeto el bienestar del *nasciturus* (aquí el embrión implantado y el feto humanos) y el favorecimiento de su desarrollo, “o estuviera amparada legalmente”<sup>XIV</sup>.

Pues bien, este precepto figuró precisamente entre los impugnados con ocasión del recurso interpuesto en su día contra la citada ley, por cuanto los recurrentes invocaron que abría la puerta a otras agresiones contra el embrión que pudieran decidirse en el futuro (a través de nuevos instrumentos normativos). Para evitar esa posibilidad, el Tribunal matizó que, si bien había que descartar su inconstitucionalidad completa, la mención a la posibilidad de considerar legítima la intervención con fines diagnósticos en el embrión dentro del útero y en el feto cuando se encontrara “amparada legalmente”, sólo era constitucional en la medida en que este último inciso se considerara como una remisión a la regulación de los supuestos de aborto no punible recogidos en el Código Penal<sup>XV</sup>.

En otras palabras, lo que quiso decir el Tribunal es que había de tratarse de una intervención diagnóstica dirigida a constatar la existencia de graves taras físicas o psíquicas en el embrión o feto, de cara a una eventual interrupción voluntaria del embarazo (como es sabido, la indicación eugenésica constituye uno de los supuestos de aborto despenalizado). De esta manera, el Tribunal Constitucional

cortaba cualquier otra interpretación que pudiera esgrimirse en el futuro para reducir la protección del embrión y condicionar su vida.

Los recurrentes contra la mencionada ley de reproducción de 1988 atacaron también los preceptos de la misma que hacían referencia a la investigación y experimentación con embriones, sobre la base de considerar que en la citada normativa, que a su juicio permitía intervenciones que no obedecían a una finalidad estrictamente diagnóstico-terapéutica, se omitía una regulación positiva del *estatuto del embrión* y, con ello, se subordinaba la vida y el desarrollo del fruto de la concepción a lo decidido en cada caso por médicos u órganos administrativos, lo que suponía negarle al embrión la protección constitucionalmente obligada durante toda la gestación<sup>XVI</sup>.

Pero lo cierto es que el Tribunal Constitucional discrepó también del citado motivo de impugnación, entendiendo que al resultar evidente que la ley en ningún caso permitía la experimentación con *embriones viables*<sup>XVII</sup>, como tampoco más investigación sobre ellos que la de carácter diagnóstico o de finalidad terapéutica o de prevención, debían considerarse suficientemente cubiertas para los embriones las exigencias de protección jurídico-constitucional que para dichas realidades biológicas se derivan del reconocimiento del derecho a la vida<sup>XVIII</sup>. Como se dirá más adelante, esta situación ha cambiado con la ley de reproducción de 2006 que sí permite la investigación con los embriones viables congelados, con lo que se plantea en nuestros días el interrogante sobre la constitucionalidad de dicha medida.

Por otro lado, es importante recordar que nuestro Tribunal, en 1985 y con ocasión de su Sentencia sobre el recurso de inconstitucionalidad presentado contra la ley de despenalización parcial de la interrupción voluntaria del embarazo, rechazó que el *nasciturus* fuera titular del derecho fundamental a la vida proclamado en el artículo 15 de la Constitución Española, decisión que fue confirmada posteriormente en las sentencias que resolvieron los citados recursos contra la ley de reproducción y contra la ley de embriones, en las que el Tribunal negó la condición de persona, en su dimensión jurídica, al embrión *in vitro*<sup>XIX</sup>.

Ahora bien, lo anterior no significa en modo alguno que el *nasciturus* y el embrión *in vitro* sean considerados en el ordenamiento jurídico español como meros objetos de derecho, y por ello susceptibles de apropiación, pues gozan también de protección constitucional, ya que, como dijo el Tribunal, “los preceptos constitucionales relativos a los derechos fundamentales y libertades públicas pueden no agotar su contenido en el reconocimiento de los mismos, sino que, más allá de ello, pueden contener exigencias dirigidas al legislador en su labor de continua configuración del ordenamiento jurídico, ya sea en forma de las llamadas garantías institucionales, ya sea en forma de principios rectores de contornos más amplios, ya sea en forma de bienes jurídicos constitucionalmente protegidos”<sup>XX</sup>.

Es decir, para el Tribunal Constitucional el embrión debe considerarse un bien jurídicamente protegido, por efecto indirecto de los mismos derechos fundamentales atribuibles a las personas nacidas, aunque es el legislador al que corresponde en cada momento determinar el alcance de dicha protección, por ejemplo, a través de la regulación de las técnicas de reproducción asistida y otras normas que se refieren a la realidad embrionaria.

A partir de lo manifestado, el Tribunal Constitucional dejó claro igualmente que los embriones *in vitro* no gozan de una protección equiparable a la de los ya transferidos al útero materno<sup>xxi</sup>, con lo que se abonó en la práctica a una concepción gradualista del nivel de protección que merece la realidad embrionaria en función de la situación de desarrollo biológico en la que se halle en cada momento. En cierta medida, esta situación se observa en los textos legales a través de la ya comentada distinción entre el preembrión y el embrión.

A modo de colofón, de la doctrina del citado Tribunal puede extraerse que las normas constitucionales protegen al embrión, aunque no le reconozcan como titular en sentido estricto del derecho a la vida, que sí corresponde plenamente a la persona nacida; y que el legislador ha de dictar normas que concreten esa protección, como por ejemplo las que se contienen, con mayor o menor acierto, en la regulación de las técnicas de reproducción asistida.

#### 4. La protección del embrión a partir de la reforma de 2003 (2003-2006)

Con el objetivo de dar salida al elevado número de embriones congelados en los bancos de los centros sin un destino determinado, bien por desentendimiento de los progenitores, bien por las limitaciones legales respecto del plazo de congelación, se dictó en 2003 una ley de reforma parcial de la ley de reproducción de 1988<sup>xxii</sup>, conocida como la “ley Pastor de la reproducción”<sup>xxiii</sup>.

Dentro de esta modificación legal se estableció que en lo sucesivo, salvo en casos patológicos excepcionales<sup>xxiv</sup>, ya no podrían generarse embriones sobrantes, para lo que se fijó como regla general una limitación de un máximo de tres fecundaciones de ovocitos que pudieran ser transferidos a la mujer en el mismo ciclo. Sólo en los citados casos excepcionales, el plazo de conservación de los embriones que se congelaran podía prolongarse hasta el final de la edad fértil de la mujer, siempre y cuando se suscribiera por los progenitores un compromiso de responsabilidad sobre los propios embriones que garantizara un destino reproductivo como única alternativa<sup>xxv</sup>.

Lo cierto es que la mencionada restricción del número de fecundaciones por ciclo resultó una medida fijada de espaldas a la realidad clínica, ya que para poder conseguir tres embriones viables es necesario habitualmente fecundar más de tres ovocitos. Sin embargo, hay que reconocer que otros aspectos de esta reforma de 2003 sí tuvieron importancia en pro de la protección del embrión, como fue el establecimiento por primera vez en la ley de una prohibición de transferir más de tres embriones a una

mujer por cada ciclo, al objeto de evitar la gestación múltiple y la práctica de la reducción embrionaria<sup>xxvi</sup>.

En esta misma línea de protección del embrión, la ley de 2003 incluyó la obligación consistente en que, antes de iniciar un tratamiento de reproducción asistida, era necesario comprobar que la pareja, o la mujer en su caso, no tuvieran embriones conservados en algún otro centro, impidiendo la generación de unos nuevos hasta que no se utilizaran los congelados<sup>xxvii</sup>. Es importante resaltar que esta previsión no existe en la legislación vigente de 2006, lo que supone en la práctica una desprotección evidente de los congelados.

De todas formas, debe significarse que al tiempo que se incorporaron entonces las citadas medidas protectoras del embrión, la ley de 2003 estableció respecto de aquellos embriones que estuvieran congelados con anterioridad a su entrada en vigor<sup>xxviii</sup>, que las parejas progenitoras, o la mujer en su caso, podían determinar su destino de acuerdo con cuatro alternativas de posible elección directa<sup>xxix</sup>: el mantenimiento de su criopreservación hasta que les fueran transferidos, la donación a otras parejas con fines reproductivos, la donación para la investigación o, incluso, su descongelación sin otros fines, lo que equivalía a su destrucción.

Sorprendió entonces a algunos que para estos casos no se hubiera hecho una jerarquización de las opciones primando el *favor vitae* de los embriones, o lo que es lo mismo, apostando por intentar primero asegurar un destino reproductivo del embrión por delante de otras alternativas que conllevan su inevitable destrucción.

Pero el hecho cierto es que, así como para los embriones que se generaran a partir de la reforma de 2003, el legislador fijó un régimen garantista (por el que se limitaba su creación más allá de los necesarios para un ciclo), reforzando el nivel de protección establecido en la ley de 1988, paradójicamente, para los que ya estaban congelados en 2003 la desprotección resultó notable, ya que podían ser destruidos sin más a voluntad de las parejas.

## 5. La protección del embrión en la vigente ley de reproducción de 2006

El nivel de protección del embrión en la ley de reproducción de 2006, se deriva de las posibilidades de actuación sobre el embrión a través, por ejemplo, del diagnóstico genético preimplantatorio (en adelante DGP), y de los destinos posibles que pueden decidir los progenitores o los centros, con especial relevancia de la opción de destrucción o descongelación. A continuación analizamos la regulación en estos aspectos.

### 5.1. Las actuaciones diagnósticas y terapéuticas sobre el embrión<sup>xxx</sup>

En la ley de reproducción de 2006 se prevé con relación al DGP la autorización directa de la técnica en dos casos, en los que bastará simplemente con comunicar su realización a la autoridad sani-

taria correspondiente, que habrá de informar a su vez a la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida<sup>xxxí</sup>: a) la detección de enfermedades hereditarias graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal con arreglo a los conocimientos científicos actuales, con objeto de llevar a cabo la selección embrionaria de los no afectados para su transferencia; b) la detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del embrión (cromosopatías fundamentalmente)<sup>xxxii</sup>.

Hay que recordar que, conforme se establece en la ley, la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida es el órgano colegiado, de carácter permanente y consultivo, dirigido a asesorar y orientar sobre la utilización de las técnicas, a contribuir a la actualización y difusión de los conocimientos científicos y técnicos en esta materia, así como a la elaboración de criterios funcionales y estructurales de los centros y servicios donde aquéllas se realizan<sup>xxxiii</sup>. Aunque se contempla también la existencia de comisiones homólogas que se constituyan en las Comunidades Autónomas, se remarca, no obstante, su naturaleza de comisiones de soporte y referencia de la Comisión Nacional, con quien han de colaborar en el ejercicio de sus funciones<sup>xxxiv</sup>.

Asimismo, la ley de 2006 no cierra la puerta a otras situaciones en las que pueda efectuarse la selección de embriones mediante DGP, si bien las condiciona a la aprobación expresa, caso a caso, de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe preceptivo favorable de la citada Comisión Nacional, que deberá evaluar las características clínicas, terapéuticas y sociales de cada caso<sup>xxxv</sup>.

Por último, incorpora también la autorización del DGP extensivo o con finalidad terapéutica para terceros, estableciendo que la aplicación de las técnicas de DGP, combinadas con la determinación de antígenos de histocompatibilidad de los embriones *in vitro* con fines terapéuticos para terceros, requerirá igualmente de la autorización expresa, caso a caso, de la autoridad sanitaria correspondiente, previo informe preceptivo favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida<sup>xxxvi</sup>.

Hasta la aparición de esta ley de 2006, que supone la primera regulación del DGP extensivo en España, existía un debate sobre si el marco jurídico de 1988 impedía o no esta práctica, conocida también como del “bebé salvador”, lo que condujo a algunas parejas que no deseaban o no podían esperar a que se produjera un pronunciamiento de la Administración sanitaria a salir fuera del país para poder llevarla a cabo. No obstante, hay también algún caso de realización de la técnica dentro de nuestras fronteras aprovechando el vacío legal<sup>xxxvii</sup>.

A nadie escapa que el DGP extensivo, o con fines terapéuticos para tercero, puede constituir una evidente cosificación del embrión, sobre todo en aquellos casos en los que la pareja progenitora no desea realmente tener un huevo hijo como tal, sino sólo como un medio para curar al que ya tienen.

Por otro lado, la ley de reproducción de 2006, adelantándose en el tiempo a la realidad clínica, regula también las técnicas terapéuticas en el embrión, al establecer que cualquier intervención con fines terapéuticos sobre el embrión vivo *in vitro* sólo podrá tener la finalidad de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas<sup>xxxviii</sup>, debiéndose cumplir además los siguientes requisitos<sup>xxxix</sup>: a) que la pareja o, en su caso, la mujer sola haya sido debidamente informada sobre los procedimientos, pruebas diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapia propuesta y las haya aceptado previamente; b) que se trate de patologías con un diagnóstico preciso, de pronóstico grave o muy grave, y que ofrezcan posibilidades razonables de mejoría o curación; c) que no se modifiquen los caracteres hereditarios no patológicos ni se busque la selección de los individuos o de la raza; d) que se realice en centros sanitarios autorizados y por equipos cualificados y dotados de los medios necesarios, conforme se determine mediante real decreto. Para estos supuestos, la ley dispone que se requerirá autorización de la Autoridad sanitaria correspondiente, previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida<sup>xl</sup>.

En definitiva, se observa a través de esta regulación que las posibilidades de seleccionar embriones a través del DGP se han ampliado notablemente, y que ha surgido un supuesto nuevo como es el de que dicha selección se lleve a cabo pensando en un tercero enfermo, lo que plantea el debate ético comentado sobre la instrumentalización del embrión.

### 5.2. Las opciones sobre el destino de los embriones

La ley de 2006 confiere a las parejas (o mujer sola) una serie de opciones sobre los embriones sobrantes de las técnicas de fecundación *in vitro*, que se hallan criopreservados en los bancos de los centros<sup>xli</sup>: su utilización por la propia mujer o su cónyuge, la donación con fines reproductivos, la donación con fines de investigación y el cese de su conservación sin otra utilización.

Conviene resaltar en este punto que de las posibilidades anteriores, las tres primeras se presentan como elegibles de forma directa por los interesados, sin ningún tipo de jerarquización o condicionante previo. Sólo la opción de destrucción exige el cumplimiento de un cierto plazo de tiempo como se verá más abajo.

La norma prevé, además, un mecanismo de renovación o modificación del consentimiento, consistente en que los centros, cada dos años como mínimo, habrán de dirigirse a la pareja o mujer sola para dicho cometido, bajo la advertencia de que si durante dos renovaciones consecutivas resulta imposible obtener de la mujer o de la pareja la firma del consentimiento correspondiente, los embriones pasarán a disposición de los centros que podrán destinarlos, conforme a su criterio, a cualquiera de los fines anteriores, manteniendo la confidencialidad y anonimato de los progenitores y la gratuidad y ausencia de ánimo de lucro<sup>xlii</sup>.

A continuación interesa realizar ciertas consideraciones respecto de algunas de estas opciones, en concreto sobre las relativas a la utilización por la mujer o su cónyuge, la donación para la investigación, o la posibilidad de decidir la descongelación.

#### 5.2.1. Sobre la opción de cesión para su utilización por la mujer o su cónyuge

Por lo que se refiere a la cesión de los embriones para su utilización “*por la propia mujer*”<sup>xliii</sup>, ha de entenderse que si es para su reproducción, sólo caben dos situaciones: la primera que estemos ante un caso de separación o divorcio de la pareja y que, a pesar de ello, se acuerde entre ambos progenitores que se los transfiera la mujer, pero lógicamente sin que pueda aceptarse la liberación de las obligaciones paternofiliales del varón (el embrión se habría originado constante la pareja) que será el padre legal en todo caso. El segundo escenario sería el supuesto de la fecundación *post mortem*, en los términos previstos en la ley, donde se dispone que, en caso de fallecimiento del varón, la mujer puede utilizar el material reproductor a título personal dentro de los doce (12) meses siguientes al fallecimiento<sup>xliv</sup>. Aquí por “material reproductor” habría que entender tanto el semen como los embriones.

Cabría, sin embargo, contemplar también la posibilidad de que la cesión a la mujer, para el caso de separación, divorcio o fallecimiento, fuera para decidir otros fines distintos a la reproducción, como son la investigación o la descongelación, en ambos casos dentro de los límites legales que se comentarán más abajo.

Y por lo que respecta a la cesión de los embriones para la utilización por “*su cónyuge*”, considero que el legislador sólo ha podido referirse al cónyuge femenino y no al masculino. Es decir, que el precepto se circunscribe a los casos de matrimonios de mujeres (lesbianas), en los que, también en caso de separación o divorcio, o incluso *post mortem*, podría darse un supuesto análogo al comentado del matrimonio heterosexual.

Hay que tener en cuenta que si por “cónyuge” aceptáramos en este caso también al varón, topáramos con la prohibición de no respetar el anonimato de los donantes (habría donación para la mujer receptora del embrión) y con la prohibición del útero de alquiler<sup>xlv</sup>, en el supuesto de que el varón quisiera tener el hijo exclusivamente a título personal.

#### 5.2.2. Sobre la donación para la investigación

En el caso de la donación para la investigación, la ley es rigurosa al establecer que se cuente con el consentimiento escrito de la pareja o, en su caso, de la mujer sola, previa explicación pormenorizada de los fines que se persiguen con la investigación y sus implicaciones, y ello salvo en el caso de ausencia de renovación del consentimiento conforme a lo comentado en el epígrafe V.2 (en cuyo supuesto será el centro el que decida)<sup>xlvi</sup>.

También es preciso que la investigación se lleve a cabo con base en un proyecto debidamente presentado y autorizado por las autoridades sanitarias competentes, previo informe favorable de la

Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, o del comité correspondiente si se trata de investigación relacionada con la utilización de líneas celulares a partir de células troncales embrionarias<sup>xlvii</sup>. Se exige igualmente que el embrión no se haya desarrollado *in vitro* más allá de catorce (14) días después de la fecundación del ovocito, descontando el tiempo que pueda haber estado criopreservado<sup>xlviii</sup>.

En cuanto a la posibilidad de destinar directamente los embriones sobrantes de la fecundación *in vitro* (FIV) a la investigación, sin llegar a congelarlos previamente, hay que tener presente la incidencia de las siguientes normas: la prohibición contenida en el Código Penal de fecundar óvulos humanos sin una finalidad procreativa<sup>xlix</sup>; la prohibición (infracción grave) de que se generen más embriones que los necesarios, conforme a criterios clínicos y en cada ciclo reproductivo, para garantizar en límites razonables el éxito reproductivo en cada supuesto<sup>l</sup>; la obligación de garantizar una protección adecuada del embrión y la prohibición expresa de crear embriones con fines de experimentación, proclamadas por el Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina (Convenio de Oviedo)<sup>li</sup>; y, por último, la consideración del embrión como un bien jurídico protegido a tenor de la doctrina del Tribunal Constitucional (Sentencias de 1996 y 1999 ya comentadas).

Pues bien, a mi juicio, el elenco de disposiciones legales referidas impide que, con ocasión de una FIV, se puedan generar embriones sobrantes que no tengan originariamente, y de forma exclusiva, un destino reproductivo. Por esta razón, creo totalmente contrario a la ley el planteamiento que pudiera hacerse a una pareja, que antes de la técnica hubiera manifestado su deseo de no congelar sus embriones sobrantes, de que estos últimos van a poder ser destruidos o destinados directamente a la investigación. A mi modo de ver, en este supuesto se estarían originando embriones a sabiendas de que no van a tener un destino reproductivo, lo que en la práctica constituiría una trasgresión abierta de las normas indicadas, y entre ellas la más grave del Código Penal.

A modo de conclusión, y respetando las discrepancias que me consta existen de otros colegas, considero que en los procesos de fecundación *in vitro* no se puede dar lugar, intencionadamente, a embriones sobrantes que no vayan a ser congelados y que no tengan a priori un fin reproductivo. Será sólo, posteriormente, a la vista del resultado del ciclo de la pareja, cuando ésta pueda replantearse la situación y optar por destinar sus embriones congelados a la investigación, o, cumplido el plazo máximo de congelación, cuando pueda decidir legalmente su destrucción, como se comenta en el epígrafe siguiente.

### 5.2.3. Sobre la opción de descongelación o destrucción<sup>lii</sup>

La cuestión de la destrucción de los embriones congelados fue objeto de análisis por el Tribunal Europeo de Derechos Humanos, con ocasión de su Sentencia del *caso Evans*, de 7 de marzo de 2006<sup>liii</sup>, donde se reconoció la corrección de la ley británica que condicionaba el mantenimiento de

la congelación de los embriones a la vigencia en todo momento del consentimiento de la pareja, admitiendo el derecho de cualquiera de los cónyuges a retirar su autorización y, de esa forma, a conseguir su destrucción.

La citada regulación británica, seguida también por otros países como Holanda o Dinamarca, y asumida igualmente por la jurisprudencia norteamericana (*caso Davis versus Davis*<sup>lv</sup>, *caso Kass versus Kass*<sup>lv</sup>, entre otros), no es, sin embargo, coincidente con la que rige en nuestro país a raíz de la promulgación de la ley sobre técnicas de reproducción humana asistida de 2006, que ha abogado por una mayor protección del embrión frente a la posibilidad de destrucción.

De esta forma, en la ley española se dice que los preembriones sobrantes de la aplicación de las técnicas de fecundación *in vitro* que no sean transferidos a la mujer en un ciclo reproductivo podrán ser criopreservados en los bancos autorizados para ello. También que la crioconservación de los ovocitos, del tejido ovárico y de los preembriones sobrantes se podrá prolongar hasta el momento en que se considere por los responsables médicos, con el dictamen favorable de especialistas independientes y ajenos al centro correspondiente, que la receptora no reúne los requisitos clínicamente adecuados para la práctica de la técnica de reproducción asistida<sup>lvi</sup>.

Ahora bien, el hecho de que en el citado precepto se utilicen las expresiones “*podrán ser crioconservados*” y que la congelación “*podrá prolongarse*” hasta determinado momento, refiriéndose a los embriones sobrantes, no puede ser entendido de forma aislada, sin tener en cuenta lo que se aclara más adelante respecto a la posibilidad concreta de destrucción. En efecto, la ley mencionada establece entre los fines que pueden darse a los preembriones crioconservados, los de su utilización por la propia mujer o su cónyuge, la donación a otras parejas con fines reproductivos, la donación con fines de investigación, y el cese de su conservación sin otra utilización, lo que conlleva en la práctica su destrucción<sup>lvii</sup>. Pero el precepto legal aludido condiciona esta última decisión a que, previamente, se haya agotado el plazo máximo de conservación establecido en la ley sin que se haya optado por alguno de los destinos anteriores. El plazo máximo a que se refiere la norma es el referido anteriormente vinculado a la persistencia de las condiciones clínicas adecuadas de la receptora.

En consecuencia, hasta que no llegue ese momento no debe pues accederse por un centro de reproducción a la eventual petición de la pareja (o de la mujer sola) relativa a la destrucción de sus embriones congelados, ya que hay una prohibición legal de hacerlo. A mi modo de ver, esta limitación en cuanto a la destrucción de los embriones congelados ha de ser lógicamente aplicable también a los que todavía no lo han sido, ya que resultaría un sinsentido que el legislador hubiera pretendido establecerla para el embrión congelado y desproteger completamente al que no lo ha llegado a estar todavía porque se acaba de generar *in vitro*. Y ello a pesar del citado “*podrán ser crioconservados*” que dice la ley, que entiendo supone una redacción poco afortunada del precepto, que se subsana con una

interpretación sistemática o integral del resto del articulado.

Cuestión distinta es si la pareja dejara de renovar su consentimiento sobre sus embriones congelados durante dos ocasiones consecutivas de las que le hubiera requerido el centro en tal sentido. En ese supuesto, este último sí podría decidir su destrucción u otros destinos de los contemplados en la norma, tal y como se ha comentado anteriormente<sup>lviii</sup>.

Así pues, nos encontramos con que las coordenadas generales de teórica protección de la realidad embrionaria *in vitro* en el marco jurídico español priorizan claramente las opciones reproductivas y de investigación frente a la opción de destrucción. Ahora bien, por lo que se refiere a la investigación con embriones congelados, que la ley de 2006 sobre reproducción asistida admite como un destino elegible directamente por los progenitores, cabe recordar, como ya planteamos más arriba, que su constitucionalidad puede generar dudas en la actualidad. La razón de ello es que, como se ha dicho, cuando el Tribunal Constitucional la aceptó refiriéndose a la regulación previa de 1988, lo hizo sobre la base de que entonces únicamente se admitía respecto de embriones no viables, incapaces de desarrollarse hasta dar lugar a un ser humano<sup>lix</sup>. Sin embargo, la vigente ley de 2006 acepta la investigación también respecto de los embriones viables, con lo que la rebaja en el nivel de protección de estos últimos, en relación con el establecido por el marco normativo previo, resulta evidente en estos momentos.

## 6. El embrión en la ley 14/2007 de investigación biomédica. La clonación terapéutica

La ley de investigación biomédica de 2007<sup>lx</sup>, contempla cuatro situaciones distintas en relación a los embriones. En primer lugar, la investigación con *embriones humanos que hayan perdido su capacidad de desarrollo biológico, así como con embriones (y fetos) muertos*, respecto de los que se permite su donación con fines de investigación biomédica u otros fines diagnósticos, terapéuticos, farmacológicos, clínicos o quirúrgicos<sup>lxi</sup>. En segundo lugar, la norma se refiere a las *intervenciones sobre el embrión (o el feto) vivo en el útero*, limitándola a un propósito diagnóstico o terapéutico en su propio interés<sup>lxii</sup>. En tercer lugar, se alude a la *investigación con preembriones (y ovocitos) sobrantes de las técnicas de reproducción asistida, o de sus estructuras biológicas*, con fines relacionados con la obtención, desarrollo y utilización de líneas celulares (u otros fines no vinculados a las técnicas de reproducción)<sup>lxiii</sup>. Y, en cuarto lugar, la ley prevé la investigación en la obtención de células troncales humanas con fines terapéuticos o de investigación, a partir de los denominados “*embriones somáticos*”, constituidos por la activación de ovocitos mediante transferencia nuclear<sup>lxiv</sup>.

Para todos los casos de donación de ovocitos, preembriones y embriones se precisa el otorgamiento de consentimiento expreso y por escrito de los progenitores a las investigaciones concretas que se vayan a realizar; y, además, entre otros requisitos, que se respeten los principios éticos generales en esta materia, que exista un proyecto de investigación autorizado por la autoridad estatal o autonómica competente, previo informe de la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células

y Tejidos Humanos<sup>lxv</sup>.

En lo que respecta a los citados embriones somáticos, como se ha dicho se prevé en la ley la autorización para todo el territorio español de la denominada clonación terapéutica (ya lo había sido en Andalucía<sup>lxvi</sup>). Así, se establece que “se permite la utilización de cualquier técnica de obtención de células troncales humanas con fines terapéuticos o de investigación, que no comporte la creación de un preembrión o de un embrión exclusivamente con ese fin, en los términos definidos en esta ley, *incluida la activación de ovocitos mediante transferencia nuclear*”<sup>lxvii</sup>.

Si se observa, la redacción de este precepto de la ley parte de un postulado ciertamente discutible, como es el de descartar que el resultado de “la activación de ovocitos mediante transferencia nuclear” sea un embrión propiamente dicho. Y ello se hace así por necesidad formal absoluta, ya que, en otro caso, toparía de bruces su legalidad con lo establecido en el citado Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina, de 1997, ratificado por España, en donde se proclama la prohibición de constituir embriones humanos con fines de experimentación<sup>lxviii</sup>, y previsiblemente también con lo establecido en nuestro Código Penal a propósito de la creación de embriones sin finalidad reproductiva<sup>lxix</sup>.

A este propósito, no parece consistente la postura de quienes sostienen que, en relación con los embriones, debe distinguirse entre los términos investigación (lo que permite la ley mediante la activación de ovocitos) y experimentación (lo que prohíbe el Convenio), ya que la misma no tiene proyección en la práctica profesional cotidiana. Incluso, de la valoración semántica de ambos, podría concluirse que la expresión investigación se considera de carácter más amplio y englobaría tanto la observación sin manipulación como la experimentación, entendida esta última como investigación manipulativa que introduce modificaciones en el sistema natural<sup>lxx</sup>.

Por otro lado, hay que significar también que hay autores<sup>lxxi</sup> que, acogidos fundamentalmente a una interpretación literal de los preceptos en juego, defienden la licitud de haber incorporado la clonación terapéutica dentro de la ley de investigación biomédica, sobre la base de que la generación de esa realidad biológica, definida por algunos con términos como “embrión somático” o “nuclóvolvo”, se produce por mecanismos distintos a la fecundación con gametos. No obstante, frente a dicha postura, cabría argüir que lo cierto es que aquella realidad, bajo la denominación que queramos darla, constituye una vida humana en potencia desde una perspectiva biológica, hasta el punto de que si se transfiriera al útero materno podría dar lugar a un ser humano (que además sería un clon genético), como reconocen muchos de los biólogos que trabajan en el campo de la reproducción humana.

A partir de lo anterior, la cuestión que se plantea respecto de la clonación terapéutica es la de si hemos de dar más peso en la valoración jurídica de este tema a los aspectos formales o procedimen-

tales (cómo se produce) o a los aspectos de fondo (cuál es el resultado real de la técnica), inclinándose este autor por lo segundo, como por otro lado ha sido también el criterio asumido por el Consejo General del Poder Judicial en un informe emitido a finales de 2006<sup>lxxii</sup>. De esta manera, la realidad biológica resultante de la clonación terapéutica sería en el fondo un embrión humano, y como tal habría de ser objeto de protección jurídica. Ello obligaría a considerar la imposibilidad de generarlo deliberadamente para un destino distinto al reproductivo, contrariamente a lo que se prevé en la mencionada ley de investigación biomédica.

## 7. Conclusiones

7.1. La derogada ley de reproducción asistida de 1988 establecía un marco de protección del embrión mucho más intenso que la actual ley de 2006, en cuanto que las posibilidades de decisión de los progenitores sobre sus embriones sobrantes congelados se reducían a la utilización para su propia reproducción o a la donación a otras parejas que los necesitaran también con un fin reproductivo. No se permitía la investigación con los embriones biológicamente viables (salvo en su propio beneficio) ni tampoco optar por su destrucción (lo que sólo podía ocurrir por superación del plazo máximo de congelación entonces vigente).

7.2. La reforma de la citada ley, operada en 2003, más allá de carecer en algunos aspectos de una visión realista sobre la situación clínica de las técnicas (con la limitación del número de fecundaciones se suponía que no iban a generarse más embriones sobrantes) contenía medidas de reforzamiento notable de la protección del embrión junto con otras claramente desfavorables para la realidad embrionaria. Entre las primeras, destacan la limitación legal de tres transferencias por ciclo, así como el establecimiento de un compromiso de responsabilidad de los progenitores sobre sus embriones sobrantes que les asegurara un destino reproductivo. Y entre las segundas, la posibilidad para las parejas de decidir directamente, sin mayor cortapisa, la destrucción de sus embriones congelados con anterioridad a la entrada en vigor de la reforma.

7.3. La ley de reproducción de 2006 parte de una consideración de la realidad embrionaria *in vitro* mucho más laxa que la existente en la regulación anterior. El nivel de protección que establece es claramente más bajo, lo que supone de hecho una reducción de la consideración o dignidad que se venía reconociendo al embrión humano hasta entonces. Prueba de ello es que contempla abiertamente la posibilidad de que las parejas destinen sus embriones viables a la investigación básica y que ha hecho desaparecer la obligación de aquéllas de agotar los embriones congelados antes de generar otros para intentar un nuevo ciclo. Quizá su mayor consideración en este terreno ha sido la de condicionar la opción de destrucción a la finalización de un plazo vinculado a las condiciones clínicas de la mujer, si bien no puede olvidarse que la opción de investigación (que sí se acepta como elección directa) equivale también a la destrucción del embrión.

7.4. La regulación de 2006, sobre todo en lo tocante a las posibilidades de investigar con embrio-

nes viables y de decidir la destrucción de los mismos, plantea el interrogante de su constitucionalidad, en la medida en que cuando el Tribunal Constitucional analizó tiempo atrás la corrección de la protección de la realidad embrionaria en relación con la posibilidad de investigación que contenía la ley de 1988, puso el énfasis en que esta última no permitía investigar con embriones viables, lo que entonces consideró una cuestión fundamental para declarar conforme la citada legislación con las obligaciones constitucionales de protección al embrión.

7.5. La ley de investigación biomédica de 2007, al contemplar la creación de unas realidades biológicas de carácter embrionario (mediante la denominada clonación terapéutica), directamente dirigidas a la experimentación, puede conllevar una trivialización

Penal, el Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina y la doctrina del Tribunal Constitucional anteriormente referida.

Madrid, 15 de julio de 2007

## Bibliografía

<sup>i</sup> Ley 14/2006, sobre técnicas de reproducción humana asistida.

<sup>ii</sup> Ley 14/2007, de investigación biomédica.

<sup>iii</sup> Art. 1.2 de la ley 14/2006.

<sup>iv</sup> Ver punto segundo del preámbulo de la ley 35/1988, y también definición contenida en el art. 3 de la ley de investigación biomédica, donde se dice que esta fase de desarrollo embrionario finaliza a los 56 días a partir del momento de la fecundación, exceptuando del cómputo aquellos días en los que el desarrollo se hubiera podido detener.

<sup>v</sup> Se relacionan en el art. 417 bis, del Código Penal de 1973, vigente en la actualidad según lo dispuesto en la disposición derogatoria 1.a) del Código Penal actual de 1995.

<sup>vi</sup> Ley 35/1988, de 22 de noviembre, sobre reproducción asistida.

<sup>vii</sup> Art. 3 de la ley de 1988.

<sup>viii</sup> Por nasciturus ha de entenderse el que va a nacer, al que el Derecho confiere diversos efectos favorables.

<sup>ix</sup> Art. 12 de la ley 35/1988. En el art. 13 se recogían también los supuestos de las intervenciones terapéuticas sobre el embrión vivo, «in vitro», disponiendo que las mismas no podrían tener otra finalidad que la de tratar una enfermedad o impedir su transmisión, con garantías razonables y contrastadas.

<sup>x</sup> Art. 11.3 de la ley de reproducción de 1988.

<sup>xi</sup> Art. 5 de la misma ley.

<sup>xii</sup> Abellán, F.: *Reproducción Humana Asistida y Responsabilidad Médica.- Consideraciones legales y éticas sobre casos prácticos.*- Fundación Salud 2000 y Ed. Comares, Granada, 2001, pp. 101-103.

<sup>xiii</sup> Se trata de las Sentencias del Tribunal Constitucional de fecha 17 de junio de 1999, relativa a la impugnación de la Ley 35/1988 sobre técnicas de reproducción asistida, y de la Sentencia previa del mismo tribunal de fecha 19 de diciembre de 1996, relativa a la impugnación de la Ley 42/1988, donación y utilización de embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos y órganos (esta ley ha sido derogada por la Ley 14/2007 de investigación biomédica).

<sup>xiv</sup> Art. 12.2 de la Ley sobre técnicas de reproducción asistida.

<sup>xv</sup> Fundamento Jurídico 12 de la Sentencia de 17 de junio de 1999.

<sup>xvi</sup> Apto. B), del punto 2, de los Antecedentes, de la citada Sentencia del Tribunal Constitucional de 17 de

junio de 1999.

xvii El mismo Tribunal precisó que el término “viable” hacía referencia a su capacidad para desarrollarse hasta dar lugar a un ser humano, a una persona, mientras que el término “no viable” era aplicable a los abortados o frustrados en el sentido profundo de la expresión (Fundamento jurídico 9º, aptdo. B).

xviii Aptdo. B), del Fundamento jurídico 9º de la citada resolución del 17 de junio de 1999.

xix Sentencias del Tribunal Constitucional núms. 53/1985, de 11 de abril, 212/1996, de 19 de diciembre, y 116/1999, de 17 de junio.

xx Fundamento jurídico 3º de la Sentencia 212/1996 y 5º de la Sentencia 116/1999.

xxi Fundamento jurídico 12º de la Sentencia 116/1999.

xxii Ley 45/2003, de 21 de noviembre, por la que se modificó la ley 35/1988.

xxiii Al haberse promovido por la entonces Ministra de Sanidad del Gobierno del Partido Popular, Ana Pastor.

xxiv Esos casos se establecieron tiempo después de forma muy amplia, hasta el punto de que invirtieron el sentido de la norma. Concretamente mediante Real Decreto 1720/2004, de 23 de julio, que en la actualidad carece de aplicación.

xxv El art. 11 surgido de la Ley 45/2003.

xxvi V. art. 4.2, de la ley de reproducción en su redacción dada por la citada Ley 45/2003. Esta previsión se ha reproducido en los arts. 3.2 y 26.2, b, 10ª (infracción grave) de la ley 14/2006.

xxvii Art. 11.4. Se dejaba a salvo el que pudiera concurrir algún impedimento legal para utilizarlos.

xxviii La entrada en vigor se produjo el 23 de noviembre de 2003.

xxix Disposición final primera de la Ley 45/2003.

xxx Abellán, F.: *Selección Genética de Embriones: entre la libertad reproductiva y la eugenesia*, Fundación Salud 2000 y Ed. Comares, Granada, 2007, pp. 39-42.

xxxi V. art. 12.1 de la ley de reproducción de 2006, anteriormente indicada.

xxxii En ambos casos se trataría de preembriones.

xxxiii V. art. 20.1 de la misma ley. También art. 20.5 (párrafo primero) donde se remarca que “La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida deberá ser informada, con una periodicidad al menos semestral, de las prácticas de diagnóstico preimplantacional que se lleven a cabo conforme a lo dispuesto en el art. 12.1”.

xxxiv Art. 20.6 de la ley de 2006.

xxxv V. art. 12.2 de la ley en relación con el art. 20.4, b) del mismo texto legal, donde se establece que será preceptivo el informe de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida para la autorización ocasional para casos concretos y no previstos en la ley de las técnicas de diagnóstico preimplantacional, así como en los supuestos previstos en el art. 12.2.

xxxvi También art. 12.2 antes citado de la ley de 2006. La Comisión deberá evaluar también en este supuesto las características clínicas, terapéuticas y sociales de cada caso.

xxxvii Está documentado el realizado en 2003 en Tenerife respecto de una niña diagnosticada de leucemia eosinofílica, necesitada de trasplante de médula ósea, y respecto de la que sus padres no eran compatibles, por lo que la madre llevó a cabo una FIV para tener un hijo que sí lo fuera, y ello a pesar de que en el banco de donantes había uno no familiar que sí era compatible. El caso trascendió porque los padres pidieron el reintegro de gastos de la asistencia al Servicio Canario de Salud, lo que les fue denegado. Sentencia del Tribunal Superior de Justicia de Canarias, Sala de lo Social, de 15 de diciembre de 2005.

xxxviii Art. 13.1 del mismo texto legal.

xxxix Art. 13.2 de la ley de reproducción asistida de 2006.

xl Art. 13.3 de la misma ley.

xli Art. 11.4 de la ley 14/2006.

xlii Art. 11.6 de la misma ley.

- xliv Art. 9 de la ley de reproducción asistida de 2006.
- xliv Art. 10 de la misma ley.
- xlvi V. art. 15 de la ley 14/2006.
- xlvi Art. 15.1, d) de la norma. Este comité es la Comisión de garantías para la donación y utilización de células y tejidos humanos, creada por la ley de investigación biomédica.
- xlvi Art. 15.1, b) de igual ley.
- xlvi Art. 160.2 del Código Penal.
- l Art. 26.2, b, 9ª de la ley de reproducción asistida de 2006.
- li Art. 18 del Convenio.
- lii *Selección genética de embriones: entre la libertad reproductiva y la eugenesia*, ob. cit., pp. 42-45.
- liii Sentencia del Tribunal Europeo de Derechos Humanos (Sección 4ª), *caso Evans contra el Reino Unido*, de 7 de marzo de 2006 (Demanda núm. 6339/05).
- liv *Davis v. Davis*, 842 S.W. 2d 588 (Tennessee 1991).
- lv *Kass v. Kass*, 235, A.D. 2d, 150, 663 N.Y.S. 2d 581 (Nueva York 1997).
- lvi Art. 11. 3 de la ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción humana asistida.
- lvii Art. 11.4 de la misma ley.
- lviii Art. 11.6 de la citada ley.
- lix El fundamento jurídico 9, B) de la Sentencia del Tribunal Constitucional núm. 116/1999, que resolvió el recurso de impugnación contra la ley de reproducción de 1988 decía lo siguiente: "Es evidente que la Ley en ningún caso permite la experimentación con preembriones viables, como tampoco más investigación sobre ellos que la de carácter diagnóstico, o de finalidad terapéutica o de prevención. Esta apreciación es fundamental en orden a examinar la conformidad de este sistema de requisitos a las exigencias de protección jurídico-constitucional que se derivan del art. 15 C.E."
- lx Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (B.O.E. de 4 de julio de 2007).
- lxi Art. 28 de la ley, donde se establece que los profesionales integrantes del equipo médico que realice la interrupción del embarazo no intervendrán en la utilización de los embriones.
- lxii Art. 30 de la misma norma.
- lxiii Art. 34.1 también de la Ley de Investigación biomédica.
- lxiv Art. 33.2 de la ley comentada.
- lxv Art. 34 de la ley de investigación biomédica.
- lxvi Ley 1/2007, de 16 de marzo, de la Junta de Andalucía, por la que se regula la investigación en reprogramación celular con finalidad exclusivamente terapéutica.
- lxvii Se trata del art. 33.2 de la ley.
- lxviii V. art. 18.2 del Convenio. Instrumento de Ratificación publicado en el B.O.E. de 20 de octubre de 1999.
- lix En el art. 160.2 se establece que serán castigados con la pena de prisión de uno a cinco años en inhabilitación especial para empleo o cargo público, profesión u oficio de seis a diez años quienes fecunden óvulos humanos con cualquier fin distinto a la procreación humana.
- lxx V. informe de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, de 2000, citado en la obra de Abellán, F.: *Reproducción humana asistida y responsabilidad médica. Consideraciones legales y éticas sobre casos prácticos*, Fundación Salud 2000 y Editorial Comares, Granada, 2001, p. 145.
- lxxi V. Romeo Casabona, C. Mª.: «La cuestión jurídica de la obtención de células troncales embrionarias humanas con fines de investigación biomédica. Consideraciones de política legislativa»,

## DIRECTIVAS DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO 2004/23/CE Y 2006/17/CE, RELATIVAS A LAS NORMAS Y REQUISITOS TÉCNICOS PARA LA DONACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS Y TEJIDOS HUMANOS Y SU RELACIÓN CON LAS RECOMENDACIONES EUROPEAS DE LAS SOCIEDADES CIENTÍFICAS

NVicente Jasa; M.A. Baile y A. Calvo

Servicio de Ordenación y Acreditación Sanitaria, Dirección de Planificación y Ordenación Sanitaria. Departamento de Sanidad. Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz. Correo electrónico: [vjasa@ej-gv.es](mailto:vjasa@ej-gv.es)

### Introducción

Desde 1988, año en que se publica la primera ley de reproducción asistida, en los sucesivos desarrollos normativos posteriores de la misma y en la última ley de 2006, no se le ha dedicado mucho espacio a los estándares requeridos para la práctica de la reproducción asistida. Al contrario de lo que ocurre en otras actividades clínicas en donde la normativa vigente claramente establece cómo debe organizarse y los controles mínimos que deben realizarse, por ejemplo en un banco de sangre, no ha ocurrido lo mismo para un laboratorio de andrología, de fertilización *in vitro* (FIV), de biopsia embrionaria o en un banco de embriones, óvulos o tejido ovárico o testicular. En los últimos años podemos estar ante un punto de inflexión vas de su uso, surge la necesidad de disponer de un marco unificado a fin de garantizar unas normas elevadas de calidad y seguridad en cuanto a la obtención, evaluación, procesamiento, almacenamiento y distribución de tejidos y células en toda la Comunidad Europea y de facilitar los intercambios para los pacientes que reciben cada año terapias con tejidos. Así se elaboran y publican la **Directiva 2004/23/CE**, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos y la **Directiva 2006/17/CE** relativa a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención, y la evaluación de células y tejidos humanos. Ambas Directivas se incorporan al derecho interno mediante el **Real Decreto 1302/2006**, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos (BOE nº 270, de 11 de noviembre de 2006). Con posterioridad se publica la **Directiva 2006/86/CE**, de 24 de octubre por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos graves y determinados requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos. En la misma se señala como fecha a más tardar para su puesta en vigor en los Estados miembros la del 1 de septiembre de 2007.

## 2. Metodología

Búsqueda bibliográfica de la literatura existente sobre el tema.

Selección y síntesis de aquellos artículos donde se reflejan los aspectos ético-legales en relación a la reproducción asistida.

Consulta a expertos en el área: Dirección de Régimen Jurídico del Departamento de Sanidad y Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos.

Presentación de la nueva normativa de células y tejidos humanos a los servicios de RHA, y valoración de la situación actual.

Elaboración de cuestionario de evaluación de los servicios de reproducción humana asistida.

## 3. Directivas Europeas sobre trasplantes de células y tejidos.

Cada vez es más frecuente la circulación o el intercambio de tejidos y células entre diferentes estados, a través de un espacio europeo abierto y sin fronteras. En este sentido, para garantizar la máxima calidad y seguridad de los tejidos y células destinados a la aplicación humana, y dado las diferencias existentes entre Estados miembros en la regulación de actividades, se hace necesario contar con normas básicas que sean operativas en toda la Unión Europea.

El tratado de Ámsterdam de la Unión Europea, en su artículo 152, otorga capacidad a la Comunidad Europea para establecer estándares de calidad y seguridad para la utilización de sangre y derivados, órganos, tejidos y otras sustancias de origen humano.

El procedimiento de elaboración de las Directivas está todavía en revisión.

En la actualidad se realiza siguiendo estos pasos:

Un Comité de Reglamentación, formado por expertos de los Estados miembros, elaboran el documento técnico a partir de un borrador que sale del Departamento correspondiente. En estos temas es el Departamento de Salud Pública y Protección de los Consumidores. Cada Estado miembro nombra a su representante.

El Comité de Autoridades Competentes da el visto bueno al documento definitivo y posteriormente cada autoridad competente organiza la transposición e informa de los avances o los datos a suministrar periódicamente, así como de los procedimientos de inspección para asegurar su cumplimiento y resultados.

El Departamento Jurídico de la Unión Europea escribe el texto definitivo en las diferentes lenguas oficiales.

Los Estados miembros evalúan el documento.

La Comisión Europea (el órgano de gestión correspondiente en temas de salud) aprueba el texto definitivo que va a ser adoptado en el Consejo de Ministros de la Unión Europea.

Con el procedimiento actual, la participación de expertos está supeditada a las decisiones de cada uno de los Estados miembros a la hora de elegir a sus representantes en el Comité de Reglamentación y a la influencia de expertos y sociedades científicas en los Departamentos Europeos.

### 3.1 Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004.

La Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación,

el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos que entró en vigor el 8 de abril de 2004.

La propuesta de Directiva fue adoptada por la Comisión Europea en junio del 2001 y consecuentemente presentada al Consejo y al Parlamento Europeo para su estudio y aprobación a través del procedimiento de *Codecisión*. El complejo procedimiento de *Codecisión* consiste, en esencia, en que las dos instituciones comunitarias con capacidad legislativa, Parlamento y Consejo, aprueben y acuerden el texto presentado por la Comisión. En diciembre del 2003, más de un año y medio después, se alcanzó un acuerdo político que permitió la adopción de este texto legislativo.

Su objetivo era establecer unos criterios uniformes para todos los Estados miembros de la UE para la importación /exportación de determinados tejidos, la disponibilidad de tejidos donados y evitar errores procedentes de los sistemas de codificación y de clasificación y de esta forma promover el mayor nivel de protección posible para asegurar la salud pública en lo que respecta a la calidad y la seguridad de los tejidos y las células para su uso en humanos.

En el considerando 7 se especifica que la Directiva debe aplicarse a los tejidos y células, incluidas las células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, del cordón umbilical (sangre) y de la médula ósea, a las células reproductivas (óvulos, espermatozoides), a las células y tejidos fetales y a las células troncales adultas y embrionarias. De esta manera quedan incluidas determinadas actividades de los Centros y Unidades de Reproducción Humana Asistida en la normativa europea y en sus posteriores desarrollos y trasposiciones.

En el considerando 12, la Directiva permite adoptar a los estados miembros sus propias decisiones sobre el uso o no de cualquier tejido específico de células humanas. Las diferencias religiosas y culturales entre los diversos Estados miembros, además del respeto a su idiosincrasia y soberanía en estos aspectos quedan reflejadas en el considerando. No obstante se señala que si se autoriza en un Estado miembro un uso específico de cualquier tipo de células, incluidas las células germinales y las células progenitoras embrionarias, la presente Directiva exigirá la aplicación de todas las disposiciones necesarias para proteger la salud pública, dados los riesgos específicos de estas células, sobre la base del conocimiento científico y de su naturaleza específica, y garantizará el respeto de los derechos fundamentales. Además, queda explícitamente recogido que esta Directiva no debe interferir en las disposiciones de los Estados miembros en las que se define el término jurídico de persona o individuo.

En el considerando 18 se especifica que a priori, los programas de aplicación de tejidos y células deben basarse en el principio de la voluntariedad de las donaciones y la no remuneración, en el anonimato del donante y el receptor, el altruismo y la solidaridad.

Respecto al anonimato el considerando 29 dice que como principio general no debe revelarse la

identidad del receptor o receptores al donante o a su familia, ni viceversa, sin perjuicio de la legislación vigente en algunos estados miembros sobre las condiciones de revelación, que autoriza en casos excepcionales, en particular en caso de donación de gametos, la revelación de la identidad de los donantes.

El considerando 22 se refiere a los derechos fundamentales reflejados en la *Carta de los Derechos Fundamentales de la Unión Europea* y tiene en cuenta como corresponde el convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina, *Convenio relativo a los derechos humanos y biomedicina*. Ni la carta ni el convenio prevén explícitamente la armonización ni impiden que los estados miembros introduzcan en su legislación requisitos más estrictos.

A destacar además, en el contenido de esta Directiva, el establecimiento e introducción de temas como el de trazabilidad, la notificación de los efectos y reacciones adversas, la gestión de calidad y el marco legal y las áreas en las que se han de establecer requisitos técnicos. Temas que en otras actividades sanitarias, fundamentalmente trasplantes y hemoterapia, y en algunos Estados miembros, tienen una mayor tradición e implantación, pero que en otros pudieron resultar más novedosos. Así, en el artículo 8 recoge que los Estados miembros garantizarán la trazabilidad del donante al receptor y viceversa, de todas las células y tejidos obtenidos, tratados, almacenados o distribuidos en su territorio. Esta trazabilidad también se aplicará a todos los datos pertinentes sobre **los productos y materiales** que entren en contacto con dichos tejidos. Los establecimientos de tejidos deberán conservar los datos necesarios para garantizar su trazabilidad en todas las fases. Los datos se conservarán un mínimo de 30 años después del uso clínico, los datos se podrán almacenar de forma electrónica.

El artículo 14 hace referencia a la protección de datos y a la confidencialidad, así los Estados miembros tomarán todas las medidas necesarias para garantizar que todos los datos, incluidos los de carácter genético, recogidos en el ámbito de aplicación de la presente Directiva a los que tengan acceso terceros, se hayan convertido en anónimos a fin de que el donante y el receptor no sean identificables.

El artículo 9 estipula que los Estados miembros tomarán todas las medidas necesarias para garantizar que todas las importaciones y exportaciones de tejidos y células sean efectuadas por establecimientos y centros acreditados.

De acuerdo al artículo 19, los establecimientos de tejidos velarán porque todas las donaciones de células y tejidos humanos sean sometidas a pruebas de laboratorio, conforme a los requisitos establecidos en el artículo 28 (e): pruebas de laboratorio requeridas para donantes y la selección y aceptación de las células cumplen los requisitos establecidos en el artículo 28 (f): procedimientos de obten-

ción de células y tejidos y recepción en el establecimiento de tejidos.

En el anexo se recoge la información que se ha de facilitar sobre la donación tanto de donantes vivos como de donantes fallecidos.

### 3.2. Directiva 2006/17/CE de la Comisión de 8 de febrero de 2006.

Aplica la Directiva 2004/23/CE en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos y que entró en vigor el 1 de noviembre de 2006.

La Directiva presenta definiciones de las células reproductoras, donación por la pareja, uso directo y criterios técnicos para la selección del donante. Recoge las pruebas necesarias para la selección del donante y establece los criterios de selección y análisis de laboratorio a que deben someterse los donantes de células reproductoras (Anexo III).

### 3.3. Directiva 2006/86/CE de la Comisión de 24 de octubre de 2006.

Aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos graves y determinados requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos.

Esta Directiva regula la calidad y seguridad de las células y los tejidos humanos durante la codificación, procesamiento, preservación, almacenamiento y distribución al centro sanitario en el que se aplicarán al cuerpo humano. Con tal fin, se establecen requisitos específicos de trazabilidad y un procedimiento comunitario para la notificación de las reacciones y efectos adversos graves.

En su artículo 6.2, notificación de efectos adversos graves, dice que si se trata de un caso de reproducción asistida, se considerará un efecto adverso grave cualquier tipo de identificación incorrecta o confusión de gametos o embriones. Todas las personas, organizaciones de obtención u organizaciones responsables de la aplicación en seres humanos que realicen reproducción asistida comunicarán estos incidentes a los establecimientos que suministren los tejidos para la consiguiente investigación y notificación a la autoridad competente. Además, recoge los requisitos para la acreditación, designación, autorización, o aprobación de los establecimientos de tejidos, y los requisitos para autorización de métodos de preparación de tejidos y células en los establecimientos de tejidos.

## **4. Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre.**

Se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células de tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

Mediante este Real Decreto se incorporan a nuestro ordenamiento jurídico los contenidos de las

Directivas Europeas 2004/23/CE y 2006/17/CE, por lo tanto se incluyen los aspectos anteriormente señalados de sendas Directivas y otros de la Directiva 2006/86/CE. En su disposición transitoria segunda establece un plazo de adaptación a las normativas de los países de 12 meses desde su entrada en vigor al día siguiente de su publicación, es decir hasta el 12 de noviembre de 2007.

En la elaboración de este Real Decreto se ha tenido en cuenta la Ley 30/1979, de 27 de octubre, sobre extracción y trasplante de órganos, las referencias a la utilización terapéutica de los tejidos humanos de la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios y la ya mencionada Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, en lo que se refiere a la regulación de las células reproductoras. Por último, desde el punto de vista organizativo, también se han tenido en cuenta las previsiones del Real Decreto 2070/1999, de 30 de diciembre, por el que se regulan las actividades de obtención y utilización clínica de órganos humanos y la coordinación territorial en materia de donación y trasplante de órganos y tejidos.

El Real Decreto regula las actividades relacionadas con la utilización de células y tejidos humanos y los productos elaborados derivados de ellos, cuando están destinados a ser aplicados en el ser humano.

Las actividades reguladas incluyen su donación, obtención, evaluación, procesamiento, preservación, almacenamiento, distribución, aplicación e investigación clínica. Este Real Decreto se aplicará a las células reproductoras en todo lo no previsto en la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, y en su normativa de desarrollo.

*Se especifica claramente que los programas de extracción y utilización de tejidos y células deben basarse en los principios de voluntariedad, anonimato entre donante y receptor, altruismo, gratuidad y solidaridad.*

En él se recogen estándares de calidad que deben seguirse en todos los procesos (desde la donación, procesamiento y almacenado hasta la distribución de los tejidos y células para uso clínico), incluyendo los criterios de selección y evaluación del donante, las condiciones necesarias para la obtención de tejidos, los requisitos para su procesamiento, las condiciones de almacenaje, empaquetado, registro, etiquetado y transporte, así como la documentación que debe acompañar al tejido o grupo celular y los requisitos para su distribución.

Estos requisitos se aplicarán a todos los tejidos y células humanas, entre las que se encuentran las células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, cordón umbilical o médula ósea; las células reproductoras (gametos y embriones); las células y tejidos fetales y las células troncales adultas y

embrionarias cuando su finalidad sea el uso terapéutico o la aplicación clínica en humanos. No se incluye la sangre y hemoderivados (salvo los progenitores hematopoyéticos) ni los órganos humanos, objeto de otras regulaciones.

Los centros deberán desarrollar y mantener actualizado *un sistema de calidad y de gestión de calidad*, que incluya como mínimo a) Manuales de procedimientos operativos de las actividades autorizadas y de los procesos críticos. b) Manuales de formación y referencia, c) Formularios de transmisión de la información, d) Datos relativos al origen y el destino de los grupos celulares o tejidos, e) Información sobre la trazabilidad de las células o tejidos, f) Sistema de detección y comunicación de efectos y reacciones adversos.

Se prevé también un *sistema de recogida y custodia de la información* relativa a sus actividades que asegure la trazabilidad de todas las células y tejidos procesados que en el caso de que el sistema tenga formato electrónico, debe asegurarse la existencia de copias de seguridad, y un *Sistema de biovigilancia* que permitirá notificar, registrar y transmitir información sobre los efectos y reacciones adversas graves que puedan haber influido o pudieran influir en la calidad y seguridad de las células y tejidos y que puedan atribuirse a los procesos de obtención, evaluación, procesamiento, almacenamiento y distribución de las células y tejidos, así como toda reacción adversa grave observada durante o a raíz de la aplicación clínica de las células y/o tejidos, y que pudiera estar relacionada con su calidad y seguridad.

Desde el Ministerio de Sanidad y Consumo se está tratando de implantar un sistema de biovigilancia (trasplantevigilancia) cuyo programa informático se probará en las Comunidades Autónomas de Galicia y del País Vasco, en el que se pretende recoger todas las declaraciones que se realicen provenientes tanto de actividades clínicas de implante de tejidos como de actividades de reproducción humana asistida.

## 5. Experiencia en la Comunidad Autónoma del País Vasco

En la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), a lo largo de 2005 a 2007 se ha desarrollado un programa de visitas por los centros y servicios de Reproducción Humana Asistida autorizados, dos por Centro o Unidad, con los objetivos de:

Presentación de la Directiva Europea.

Revisión de funcionamiento de los Centros y Unidades.

Determinación de las áreas y puntos de mejora para adoptar las novedades que se recogían en la normativa.

De cada visita se envió un informe en donde se recogían las áreas de mejora detectadas. En la visita siguiente se comprobaban los mecanismos puestos en marcha por el Centro para la consecución de las mejoras señaladas.

Como conclusión cabe señalar que en todos los centros y unidades se partía de una situación aceptable en cuanto al cumplimiento de las novedades presentadas si bien, en todos ellos y con distintos grados y en diferentes parcelas, se han identificado importantes áreas de mejora. Los principales y más comunes temas en los que se han señalado las mejoras son:

Gestión de Calidad: completar registros y protocolos, así como la gestión y control de los mismos.

Medidas de seguridad y confidencialidad en la información: mejorar y completar las existentes.

Serotecas: Archivo de sueros de donantes alogénicos o potencialmente alogénicos durante dos años a partir de la última transferencia.

A señalar la disposición favorable y el esfuerzo de todos los Centros y Unidades en introducir las correcciones necesarias para alcanzar los requisitos normativos. En eso estamos.

### Bibliografía

Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.

Directiva 2006/17/CE de la Comisión de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos.

Directiva 2006/86/CE de la comisión de 24 de octubre de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del parlamento Europeo y del consejo en lo que se refiere a los requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.

Estudio y tratamiento de la pareja estéril. Recomendaciones de la SEF. 2007 ISBN 978-84-93-5464-1-0.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

Revista Iberoamericana de Fertilidad. Es tiempo de cambios: La Directiva Europea sobre tejidos y células. 23 (1) enero-febrero 2006.

Soini S. et al. The interface between assisted reproductive Technologies and genetics: technical, social, ethical and legal issues. European Journal of Human Genetics 2006; 14:588-645.

The need for interaction between assisted reproduction technology and genetics. Recommendations of the European Societies of Human Genetics and Human Reproduction and embryology. European Journal of Human Genetics 2006; 14:509-11.

**Anexo I. Síntesis de las Recomendaciones de la Sociedad Europea de Fertilidad y Embriología.****RECOMENDACIÓN SÍNTESIS RECOMENDACIÓN****Prácticas de rutina**

Exploración mediante: HC individual, familiar y reproductiva.

Ofrecer consejo y pruebas genéticas apropiadas.

Remitir al genetista si se sospecha causa genética.

Derecho a la información sobre las técnicas de RHA y presentación de resultados de reproducción del centro.

Respetar la autonomía de las parejas y tener en cuenta el interés del niño.

**Selección del donante**

Conocer la historia reproductiva familiar y de donantes masculinos y femeninos y realizar las pruebas genéticas necesarias.

No excluir donantes heterocigóticos para enfermedades autonómicas recesivas. Ofrecer consejo genético a los donantes seleccionados.

Diagnóstico Genético Pre-implantacional DGP

En familias con enfermedades hereditarias, el DGP como alternativa disponible.

Parejas con alto riesgo genético deberían ser vistas por genetista clínico o por consejero genético y valorar DGP

DGP se realizará si las parejas acepten conocer el resultado y las implicaciones del mismo.

**Cribaje genético pre-implantacional**

Hay evidencia de que el cribaje genético puede llevar a incremento potencial de tasa de embarazo y reducción de tasa de aborto mediante detección de anomalías cromosómicas numéricas.

Necesidad de ECR para valorar utilidad de la alternativa y definir indicaciones potenciales.

Si se propone el cribaje genético, debería informarse sobre indicaciones y beneficios del procedimiento. El consejo se realizaría por profesionales de RHA entrenados.

Investigación y desarrollo

Se recomienda que las nuevas técnicas y/o procedimientos se introduzcan como proyectos de investigación clínica (realización de un protocolo, aprobación por CEIC, información a las parejas de que la técnica no está completamente validada).

Se recomienda la realización de estudios prospectivos multicéntricos y estudios de cohorte para evaluar los efectos a largo plazo y los posibles efectos transgeneracionales.

Surge conflicto entre: necesidad de investigar en seguridad y necesidad de minimizar la investigación en embriones.

Se hace necesaria la investigación en aspectos ético-legales, sociales y psicológicos.

**Organización de los servicios**

Asegurar la calidad de los servicios: unificando protocolos y pruebas de laboratorio y estableciendo estándares de calidad.

Capacitación de los profesionales implicados y de equipos multidisciplinarios

Aunque las técnicas de RHA se consideran, en muchos países, de prioridad baja, hay situaciones en las que debería ser consideradas de alta prioridad, como la infertilidad en parejas jóvenes o situaciones médicas que requieren DGP.

Desarrollo de redes (*network*) entre centros que realizan DGP especialmente, para enfermedades raras.

Los documentos de CI se redactarán en un lenguaje comprensible y en soporte adecuado.

## DEBATE: DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO EMBRIONARIO

**Olga Cairó Doncos**

Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH). Clínica Corachán. Barcelona. Correo electrónico: [laboratorio@cirh.es](mailto:laboratorio@cirh.es)

### Introducción

Desde el nacimiento de la Reproducción Asistida el esfuerzo de todos los laboratorios se ha centrado en la obtención del mejor embrión viable para conseguir el nacimiento de un niño sano.

Para alcanzar este objetivo se han ido desarrollando diferentes métodos y sistemas de cultivo que favorezcan el buen desarrollo de los embriones y que nos permitan una selección más precisa del embrión con la mayor capacidad implantatoria.

A lo largo de la historia los distintos medios de cultivo, su composición, y los sistemas para cultivar embriones han ido evolucionando gracias al mayor conocimiento de la fisiología del tracto genital femenino, del embrión y al modelo animal aplicado a los humanos.

Esta ponencia pretende presentar algunos de estos diferentes sistemas - con sus pros y sus contras, sus ventajas y desventajas - para mantener en cultivo los embriones que obtenemos en el laboratorio. El objetivo es contrastar el cultivo corto hasta día 3 *versus* el largo hasta blastocisto, el cultivo agrupado de embriones en condiciones de baja concentración de oxígeno frente al monocultivo en condiciones atmosféricas. También queremos referirnos a los cultivos secuenciales o con medio único, el uso de suero materno o albúmina pura, los medios comerciales frente a la utilización de medios hechos en el mismo laboratorio y, finalmente, intentaremos mirar hacia el futuro y presentar las posibilidades de nuevos sistemas de cultivo tales como la maduración *in vitro* de ovocitos.

### Desarrollo

#### Cultivo Corto

A menudo en el laboratorio nos planteamos qué tipo de cultivo es el más adecuado para nuestros pacientes; un cultivo hasta el día 2 ó 3 o bien dejar los embriones hasta el día 5/6 esperando que alguno de ellos alcance el estadio de blastocisto y poder así realizar una mejor selección embrionaria.

En mi opinión, el cultivo largo puede ser adecuado para aquellas pacientes que tienen al menos tres buenos embriones (8 células iguales, ausencia de fragmentación...) en día 3 ya que así podemos seleccionar el más evolutivo y posiblemente realizar una buena transferencia de embrión único. Por tanto evitaríamos así embarazos múltiples. En cualquier caso, transfiriendo en día 3 ya estamos seleccionando embriones evolutivos y podemos evaluar suficientes características de estos, tales como el patrón pronuclear, el número de células, la fragmentación, la multinucleación, la simetría, etc, que pueden darnos pistas bastantes claras de qué embrión o embriones transferir (Rienzi et al., 2002; Scott et al., 2007)

Evidentemente no aconsejaría el cultivo largo de una manera sistemática. En primer lugar, hay que tener en cuenta el hecho del efecto deletéreo del cultivo *in vitro* sobre los embriones. Es posible que muchos embriones con capacidad implantatoria no lleguen a blastocisto y por tanto no tengan posibilidad de dar lugar a un embarazo manteniéndolos *in vitro*, cuando sí serían capaces de hacerlo de haber sido transferidos en un estadio más temprano. Se ha demostrado que pacientes que no tienen embriones de 8-células en día 3 y que se han llevado hasta día 5 dan un 0% de tasa de embarazo en contraste con la transferencia, en estos casos, en día 3 que da una tasa de embarazo clínico del 33.3% (Racowsky et al., 2000). *In vitro* el embrión es más lento que *in vivo* y algunos de ellos pueden detener su desarrollo.

De hecho solamente un 41,9% de 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 7 células o más de 9 respectivamente. Embriones con más de un 15% de fragmentación únicamente dan un 16,5% de buenos blastocistos y con menos de un 15% de fragmentación dan buenos blastos en un 33,3% de los casos (Alikani et al., 2000). Por tanto se demuestra que problemas en la división embrionaria que no afectan o afectan poco en un cultivo corto sí afectan al embrión después de un cultivo largo. Es evidente, pues, que el útero es el mejor incubador.

También hay estudios que demuestran alteraciones en la metilación del DNA de los embriones cultivados *in vitro*. Estas alteraciones son más importantes a más tiempo mantengamos los embriones en cultivo (Rinaudo, 2006).

Por tanto transfiriendo en el día 3 hay menos cancelaciones de transferencias y los embriones se cultivan en el lugar más fisiológico posible. Cuando no obtenemos embriones para transferir en el día 5 no podemos asegurar que estos embriones no evolucionen por causas intrínsecas a ellos mismos o por efecto del medio de cultivo.

También quiero remarcar que aparte de ser un sistema de cultivo más simple y fácil de llevar a cabo en cualquier tipo de laboratorio, cuando se dispone de pocos incubadores es vital evitar un número excesivo de aperturas para observaciones y cambios de medio, con lo que es mejor adelantar el día de la transferencia. Así también se minimizan los efectos adversos que los VOCs y otras sustancias puedan tener sobre los medios de cultivo y el aceite que los cubre.

Revisando la extensa bibliografía que existe sobre este tema encontramos estudios para todos los gustos. Muchos de ellos afirman que se obtienen mejores tasas de embarazo e implantación transfiriendo en día 5 que en día 3: Milki et al. (2000) compara el día 5 *versus* el día 3 y muestra una tasa de embarazo del 68% *versus* el 46% respectivamente y unas tasas de implantación del 47% *versus* el 20% respectivamente. La tasa de embarazo múltiple no presenta diferencia significativa.

Papanicolau et al. (2005) también presenta tasas significativamente mejores cuando transfiere en día 5 que en día 3. En estos estudios se seleccionan pacientes que al menos tengan 4 embriones de buena calidad.

Otros autores presentan estudios con tasas de embarazo similares al transferir en día +3 que en día +5 (Racowsky et al., 2000; Baladan et al., 2001; Blake et al., 2004). Tampoco encuentran diferencias significativas en cuanto a la tasa de embarazo múltiple. Otros incluso encuentran tasas de embarazo superiores cuando transfieren en día 3 que en día 5, siendo estas tasas del 77% y 52% cuando se tienen en cuenta las tasas acumulativas de ciclos con transferencias en fresco y en congelado (Levron et al., 2002).

En un primer ciclo de FIV la tasa de embarazo no presenta diferencias significativas.

Este último trabajo nos lleva a pensar en el tema de la congelación y descongelación de embriones y blastocistos. La técnica de congelación lenta está plenamente implantada en todos los laboratorios obteniéndose tasas de embarazo muy aceptables cuando congelamos embriones en día 2 o 3. Es bien sabido por todos que esto no es así en todos los laboratorios, cuando congelamos blastocistos. Hay varios grupos que presentan buenas tasas de embarazo con blastocistos descongelados, el problema es que se cancelan muchas transferencias y en muchos casos después de una transferencia en día 5 no hay embriones sobrantes para transferir en ciclos posteriores.

La vitrificación parece ser el futuro para la congelación de blastocistos, pero esta técnica todavía no está plenamente implantada en todos los laboratorios. Existen diferentes sistemas de vitrificación, diferentes medios y distintos tipos de pajuelas. Cada laboratorio debe buscar el sistema que mejor le funcione y antes de ofrecer de manera sistemática el cultivo largo asegurarse de tener un buen programa de congelación para los blastocistos sobrantes. Así, al calcular y comparar las tasas de embarazo entre las transferencias con embriones tempranos o las transferencias de blastocistos, aunque las últimas sean en ocasiones superiores, se debe tener en cuenta la tasa de embarazo acumulada cuando transferimos embriones tempranos en fresco y en congelado, ya que posiblemente se igualen o, actualmente, sean superiores.

En cuanto a la tasa de implantación, esta sólo es comparable cuando transferimos el mismo número de embriones, ya que a medida que aumentamos el número de embriones que transferimos también aumenta la posibilidad de escoger cada vez embriones de peor calidad, asumiendo que el primero que escogemos siempre es el mejor, y por tanto la tasa de implantación siempre es inferior en el grupo de pacientes que tiene más embriones transferidos. Este factor siempre está presente en este tipo de estudios (Kolibianakis, 2004).

Teniendo en cuenta todo lo dicho hasta ahora y también los resultados obtenidos por varios autores (Kolobianakis et al., 2004; Levron et al., 2002; Emiliani et al., 2003) podemos concluir que aunque la transferencia de blastocisto nos ofrece ciertos beneficios, no presenta un gran aumento en la tasa de embarazo evolutivo respecto la transferencia de embriones tempranos sobretodo si tenemos en cuenta que existe la posibilidad significativa de tener que cancelar la transferencia y la baja probabilidad de crioconservación.

#### Monocultivo y cultivo en concentración de oxígeno atmosférico

Podemos mantener los embriones en el incubador en placas con volúmenes pequeños de medio de cultivo o bien en volúmenes grandes. Los embriones podemos cultivarlos individualmente o bien de manera agrupada.

Este tema ha sido bastamente estudiado en veterinaria y los conocimientos adquiridos en este campo se han utilizado en la fecundación *in vitro* en humanos.

Es sabido que los embriones de mamífero alcanzan mayores tasas de formación de blastocistos cuando los cultivamos agrupados que si lo hacemos en grupos de pocos embriones o individualmente. Fujita et al., (2006) cultivaron embriones bovinos individualmente o en grupos de 2 a 5 embriones con una densidad constante de 5  $\mu$ l de medio por embrión. Después de 7 días de cultivo observaron que la tasa de embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto era significativamente superior cuando cultivaban más de tres embriones que cuando lo hacían individualmente o en grupos de dos.

De todas formas el tamaño, las características y las necesidades de los ovocitos y los embriones humanos son diferentes. Existen numerosos trabajos en los que se comparan diferentes volúmenes de medio de cultivo para lograr una mayor proporción de blastocistos, otros en los que se estudia la influencia del cultivo agrupado o individual sobre la tasa de formación de blastocistos y la de embarazo e implantación. Muchos de estos artículos son sobre embriones de ratón, bovinos..., algunos sobre los efectos de las distintas variaciones de cultivo en los embriones humanos en día 2 y en día 5, pero ninguno de ellos consigue dar unos resultados convincentes.

Lane y Gardner (1992) y Gardner et al., (1997) publican las ventajas de los microcultivos en los embriones de ratón. El cultivo agrupado de embriones humanos es estudiado por Moessner y Dodson (1995) y Almagor et al. (1996). En términos de un aumento considerable del desarrollo embrionario el primer trabajo, mientras que el segundo da un aumento en las tasas de embarazo. Pero los resultados que presentan estos trabajos no son del todo claros cuando tratamos de aplicar el modelo animal (Lane and Gardner, 1992, Gardner et al., 1997) al ser humano y cuando al leerlo descubrimos que uno se refiere únicamente al desarrollo embrionario, pero no dice nada de tasa de embarazo (Moessner

and Dodson, 1995) y otro da buenos resultados de embarazo pero sólo vagamente hace mención de la morfología embrionaria (Almagor). Además, sólo mantienen el cultivo un máximo de 48 h post-inseminación.

Parece que la causa de los beneficios del cultivo agrupado se encuentra en los factores autocrinos y paracrinos secretados por los embriones que ejercen un efecto de ayuda de unos hacia los otros. Cuando estos factores se excretan en volúmenes pequeños de medio de cultivo se evita el efecto dilución (Paria and Dey, 1990; O'Neill, 1998).

Por otro lado, hay autores que sugieren que no existe diferencia significativa cuando cultivamos en grupo o de manera individual. Spyropoulou et al. (1999) cultivan embriones tempranos individualmente o en grupos de 3 a 5 embriones en microgotas de 20  $\mu$ l y no encuentra diferencia significativa en tasas de embarazo, implantación ni desarrollo embrionario.

Rijnders y Jansen en 1999 tampoco encuentran diferencia significativa en la tasa de desarrollo embrionario hasta el día 5, en embriones humanos cultivados individualmente en 5  $\mu$ l de medio o 160  $\mu$ l o en grupo (de 8 a 12 embriones) en 5  $\mu$ l de medio por embrión o en 160  $\mu$ l. De todas formas encuentran que el grupo de embriones cultivados individualmente y en poco medio de cultivo es el que alcanza la mayor tasa de formación de blastocistos (45%). Este sistema presenta una ventaja adicional y por tanto es el que más me convence: cultivando los embriones de manera individual sabemos siempre de dónde procede cada uno de ellos, cómo era el ovocito, la valoración de la fertilidad, las características de cada embrión el día 2, 3, la cinética, etc. De esta manera, podemos hacer una mejor selección del embrión con mayor capacidad implantatoria.

Si los agrupamos no podemos valorar toda la historia del embrión que vamos a transferir, sino solamente las características embrionarias en el momento que hacemos la selección para transferir.

En cuanto a la influencia de los factores de crecimiento, Rijnders cree que el volumen de 5  $\mu$ l no es lo suficientemente pequeño para que no se diluyan e influyan, o en todo caso el efecto es insignificante. Otra razón, para no detectar su efecto positivo, es que estos factores influyan en estadios muy tempranos. Spyropoulou sostiene que tal vez los factores autocrinos secretados por un embrión en 20  $\mu$ l son ya suficientes para activar su desarrollo y que, en este volumen, más dosis de factores producidos por más embriones no tendrían ningún efecto. Otra consideración que podemos hacer sobre este tema es el efecto negativo que puedan tener sustancias secretadas por aquellos embriones que no se están desarrollando correctamente. Se ha demostrado el efecto deletéreo de ovocitos no fertilizados sobre embriones en división (Salahuddin et al., 1995).

En cuanto a los cultivos bajos en concentración de oxígeno (5%) o bien en la concentración atmosférica (20%) bien es cierto que hay numerosos estudios que demuestran las ventajas y beneficios de los primeros. Básicamente porque parece que se disminuyen las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el grado de fragmentación de los embriones. Se ha demostrado en varias especies de mamíferos que el cultivo bajo en oxígeno favorece la formación y desarrollo de los blastocistos (Karangenc et al., 2004). Estos estudios están basados en la presión de oxígeno existente en el oviducto y el útero de los mamíferos. Pero ¿por qué la mayoría de laboratorios mantenemos nuestros incubadores a la presión atmosférica?

En primer lugar los estudios comparativos en embriones tempranos no presentan ninguna diferencia significativa.

Dumoulin et al., en 1999, presenta un estudio en el que compara las tasas de fertilidad, desarrollo embrionario, y embarazo de embriones humanos cultivados en un 5% y un 20% de oxígeno hasta el día 3 de cultivo, no encontrando ninguna diferencia para ninguno de los parámetros. Dónde sí encuentra diferencia, a favor del cultivo al 5% de oxígeno, es en una mayor tasa de formación de blastocistos normales cuando deja en cultivo embriones sobrantes hasta día 5-6. Esta diferencia, sin embargo, no se refleja en las tasas de embarazo ni implantación con lo que supone que este efecto beneficioso del cultivo bajo de oxígeno no es lo suficientemente importante o bien no tiene un gran efecto en estadios tempranos y únicamente en estadios más tardíos. Así tal vez sí se podría aplicar para cultivos prolongados.

En segundo lugar, en este mismo estudio también se presenta la posibilidad de que mantener ovocitos y embriones humanos en un cultivo bajo de oxígeno podría llevar a un peligro de hipoxia (Byatt-Smith et al., 1991). El autor sostiene que mientras los ovocitos de ratón con un radio de 40 micras pueden satisfacer tranquilamente sus necesidades de oxígeno con una concentración del 5%, los ovocitos humanos, con un radio  $> 60$  micras se encuentran en el límite de sus necesidades de oxígeno. Esto es consistente con el hecho de que el radio máximo que limita el acceso de oxígeno al centro de la célula de mamífero es de 60 micras. Otra de las razones por las que el ovocito y el embrión humano podrían estar en peligro de hipoxia es por el carácter estático de los cultivos, ya que los ovocitos y embriones, *in vivo*, están en un constante movimiento en el interior del oviducto y el útero gracias al movimiento ciliar y muscular, lo que permite un acceso uniforme de todas las partes del embrión al oxígeno. De todas formas Dumoulin no encuentra tal problema en su estudio.

En tercer lugar tenemos un estudio más cercano, tanto en el tiempo como geográficamente, realizado por González-Utor et al., 2005 en el que compara tasa de fertilidad, embarazo, implantación, división temprana y morfología de embriones en día 2 y 3, entre dos incubadores al 5% y 21% de presión de oxígeno respectivamente. No encuentra ninguna diferencia significativa. Al contrario, el incu-

bador que está a 5% tiene un tiempo de estabilización, después de las aperturas, 7 veces mayor que el otro con lo que esto implica de gasto en balas de nitrógeno.

Así, parece que no se obtienen demasiados beneficios de mantener los embriones en cultivos bajos de oxígeno, al menos en los cultivos cortos, más bien presenta una serie de costes para el laboratorio.

### Cultivos secuenciales

Actualmente existen muchas casas comerciales que ofrecen diferentes medios de cultivo. Básicamente las dos tendencias que podemos encontrar son los medios que tratan de imitar a la naturaleza proporcionando al embrión los nutrientes necesarios en cada etapa de su desarrollo y aquellos que permiten escoger al embrión aquello que necesita en cada momento y son el resultado de la estimación concentración – respuesta hasta encontrar una respuesta óptima. Los primeros, que están basados en la concentración de una sustancia según su presencia en el ambiente natural del embrión, son los medios secuenciales y son dos medios diferentes: uno hasta día 3 y otro desde día 3 hasta 5 ó 6. Los segundos son los medios únicos y como su nombre indica es un único medio desde el día 1 hasta el día 5 ó 6.

Los medios secuenciales se diseñaron para permitir el cultivo largo hasta día 5 con garantías de obtener un buen número de blastocistos viables. La idea era sustituir los cocultivos por un sistema más simple y al alcance de todos los laboratorios pero sin comprometer los enormes beneficios que proporcionaban los cocultivos. Los cultivos secuenciales aportan nutrientes, vitaminas, oligoelementos y permiten estandarizar la técnica.

A lo largo de su desarrollo *in vivo* el embrión pasa por distintas etapas y sus necesidades metabólicas van variando. Durante estas etapas el embrión va recorriendo distintas partes del tracto reproductor femenino. Así, estudiando la composición de los fluidos del oviducto y del útero humano se desarrollaron los medios secuenciales (Gardner et al., 1996; Gardner, 1998; Ménézo, 1998). Durante y después de la fecundación, los líquidos que envuelven al ovocito y al embrión son ricos en piruvato y lactato, pero no en glucosa. En estas primeras etapas de desarrollo el embrión consume piruvato y lactato. Después de la activación del genoma embrionario (8-células / compactación) el embrión necesita como fuente de energía principal la glucosa, justo en este momento entra en el útero materno. Así la concentración de glucosa en los medios para embriones tempranos es baja, siendo alta la de lactato y piruvato. Los medios para las etapas más tardías son ricos en glucosa, contienen también piruvato y son pobres en lactato.

Gardner et al. (2002) ha sido el autor que más ha estudiado las necesidades nutricionales de los embriones y las distintas composiciones de los fluidos del tracto genital femenino por donde tiene su recorrido el embrión.

Así los medios secuenciales son básicamente dos medios distintos, donde el primero se utiliza desde la fecundación hasta el día 3 y que contiene bajas concentraciones de glucosa, aminoácidos (AA) no esenciales y EDTA que favorece la proliferación celular. Y un segundo medio que aumenta la concentración de glucosa y disminuye la de lactato, manteniéndose más o menos constante la de piruvato y con AA esenciales y no esenciales. Este segundo medio no contiene EDTA, ya que parece inhibir la formación y diferenciación de blastocistos (Gardner et al., 2000). De esta manera se pretende potenciar el desarrollo hasta blastocisto.

La extensa bibliografía existente sobre los cultivos hasta blastocisto se refiere en su mayor parte a la utilización de medios secuenciales. Al desarrollo de estos medios debemos el poder mantener nuestros embriones en cultivo hasta el día 5 ó 6 obteniendo un buen porcentaje de blastocistos.

Recientemente se han presentado unos resultados comparando las tasas de formación de embriones y blastocistos con la serie GIII de Vitrolife y la serie G5. Con la primera obtenemos una tasa de embriones con 8-células del 37,8 % y con la segunda del 43,2% ( $P<0,05$ ). Con la serie III se alcanzaban unas tasas de formación de blastocistos del 37,2% y con la nueva serie 5 del 40%. Aquí no se obtiene diferencia significativa por el bajo número de casos estudiados. Este tipo de medios están en un constante avance y desarrollo (Baladan et al., 2007).

De todas formas hay que decir que hay varios estudios donde se muestra que con medios únicos podemos también obtener buenas tasas de blastocistos, implantación y embarazo, comparables a las obtenidas con el uso de medios secuenciales (Macklon et al., 2002). Sepulveda et al., en 2006, no encuentra diferencias significativas cuando compara Global, de LifeGlobal, con medios secuenciales de Irvine. Presenta tasas de embriones en 8-células en día 3 de un 37,9% y un porcentaje de formación de blastocistos en día 5 del 42,7%.

Por tanto está claro que los dos tipos de medios son eficaces para cultivar nuestros embriones *in vitro* y cada laboratorio debe elegir aquellos medios que le proporcionen las mejores tasas de desarrollo, mejor morfología embrionaria y mayor tasa de embarazo evolutivo.

#### Suplementación de los medios con HSA (*human serum albumin*)

Los ovocitos y embriones humanos necesitan de un aporte de proteínas para su desarrollo. Estas proteínas se las podemos proporcionar suplementando los medios de cultivo con suero materno o bien con albúmina pura (HSA) o recombinante. La albúmina es fuente natural de aminoácidos y es muy abundante en el tracto genital femenino. La albúmina absorbe toxinas, es un regulador de la presión osmótica y actúa también como *buffer*.

El suero materno nos aporta unas tasas de embarazo e implantación importantes, pero presenta una serie de inconvenientes: es necesario extraer sangre de las pacientes antes de las punciones y

procesar esta sangre para la obtención del suero inactivado. Esto aumenta considerablemente el trabajo del laboratorio y requiere una preparación de medios individualizada para cada paciente. Existe también la posibilidad de transmitir ciertas enfermedades y la contaminación biológica. Su uso no está indicado en casos de enfermedades inmunológicas y en esterilidad de origen desconocido.

El uso de HSA facilita enormemente el trabajo, permite una fácil preparación de medios de cultivo, pero sobre todo proporciona una seguridad en cuanto a control de calidad y transmisión de enfermedades. La HSA comercial está sometida a todo tipo de análisis y test: hepatitis B, C, HIV, osmolaridad, pH, endotoxinas, test de esterilidad con membrana de filtración, MEA (*Mouse Embryo Assay*), etc.

Si en lugar de utilizar HSA utilizamos albúmina recombinante, evitamos al 100% cualquier posible contaminación por algún agente infeccioso, incluso con priones, por su carácter biosintético. Además, al ser un producto de alta pureza, garantiza la no variabilidad entre lotes.

Por otro lado Ali et al., en 2000, demostró que era posible capacitar semen, fertilizar ovocitos, tanto por FIV como ICSI, y obtener embriones (al menos hasta día 2) en medios con ausencia total de proteínas. De esta manera, y sustituyendo la hialuronidasa, de origen animal, por papaína, de origen vegetal, conseguía obtener embriones viables (50% tasa embarazo) evitando cualquier riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas.

Por tanto aunque la suplementación de los medios con suero materno nos proporciona unas excelentes tasas de embarazo debemos valorar el riesgo de transmisión de enfermedades, el posible efecto adverso del suero en determinadas pacientes y la menor comodidad en cuanto al trabajo del laboratorio.

#### Medios Comerciales

Siguiendo un poco con el tema anterior, también podemos plantearnos si comprar medios de cultivo comerciales o bien prepararlos en nuestro propio centro. Es posible que si nos lo hacemos nosotros mismos tengamos una seguridad del grado de frescura de estos medios pero todo el proceso de elaboración requiere disponer de una infraestructura y un personal que no es posible en todos los laboratorios. Hay que valorar si merece la pena todo el esfuerzo en tiempo y personal con los beneficios que puede aportar la fabricación casera de medios, respecto a la facilidad, comodidad y seguridad de los medios comerciales.

Los diferentes fabricantes de medios de cultivo, consideran que es esencial proporcionar un producto de alta calidad para asegurar unos resultados óptimos. La gran competencia entre ellos asegura esta calidad para los consumidores. Muchos de estos fabricantes están acreditados con Certificados de Calidad en el proceso de fabricación, manufactura y testado final de sus productos, así como en los materiales utilizados y el empaquetado del producto final. MediCult posee los Certificados ISO 9001:2000 e ISO 13485:2003 al igual que Vitrolife. Además todos los procesos cumplen los principios del GMP (*Good Manufacturing Practice*) y la fabricación se realiza en *Clean Rooms*.

Las materias primas utilizadas en la fabricación de los medios son testadas antes de su utilización

y las fuentes de proteínas tienen el grado de calidad requerido para la industria farmacéutica.

El agua utilizada cumple con todos los requerimientos para el agua purificada en la actual farmacopea europea.

Se valida la estabilidad del producto, en condiciones de uso, hasta la fecha de caducidad.

Los productos se empaquetan en cajas aislantes y a prueba de golpes, con elementos que aseguran en todo momento la cadena de frío.

Todos los productos se sirven con su correspondiente Certificado de Análisis.

El producto final es sometido a un estricto control de calidad realizándose las siguientes pruebas: pH, osmolaridad, MEA, *Hybritest*, test de Endotoxinas LAL, test de esterilidad (todos los productos están esterilizados por filtración), test de supervivencia espermática, test de inmovilización espermática, etc.

Además de toda la seguridad y comodidad que proporcionan los medios de cultivo comerciales, actualmente se fabrican bajo pedido de tal forma que se garantiza la frescura de los medios y los *stocks* de las fábricas son muy bajos y se renuevan constantemente.

En cuanto a los resultados a lo que calidad embrionaria y tasas de gestación se refiere, son totalmente comparables a la utilización de medios caseros.

### Futuro

Decir como será la Reproducción Asistida, desde el punto de vista del laboratorio, en el futuro no es fácil. Los avances en este campo son relativamente lentos. Posiblemente el futuro esté en la aplicación de una manera más sistemática del Diagnóstico Genético Preimplantacional, apoyando el cultivo de los embriones, con medios realmente eficaces, capaces de suministrar todo lo que en verdad necesita el embrión y sin aportar sustancias nocivas para ellos. La vitrificación se consolidará como la técnica de congelación más rápida y eficaz cuando esté a punto el sistema que nos garantice una muy buena supervivencia de los embriones y una buena tasa de implantación y embarazo, teniendo a los embriones protegidos frente a las posibles contaminaciones del nitrógeno líquido.

En cuanto al futuro de los sistemas de cultivo embrionario no quiero terminar sin hacer mención de la maduración *in vitro* de ovocitos. Esta técnica permite madurar ovocitos inmaduros en el laboratorio de manera relativamente sencilla. Aproximadamente un 50% de los ovocitos recuperados maduran *in vitro*. La tasa de embarazo se sitúa entre un 20 y un 30%.

Las ventajas de esta técnica están en que no hay estimulación ovárica, no hay riesgo de hiperestimulación, la monitorización es más sencilla y el coste es más bajo que el de la FIV convencional. Se

aplica principalmente en casos de ovarios poliquísticos y cuando hay antecedentes previos de SHO. También puede ser una alternativa para aquellas mujeres que no quieren someterse a una estimulación ovárica. Las desventajas son que las tasas de implantación y embarazo son menores y en cambio las de aborto son mayores. Además se obtiene un menor número de embriones para congelar. En el tema de la maduración *in vitro* de ovocitos todavía hay un camino por recorrer, que permita obtener en el laboratorio mayor número de ovocitos maduros, y por tanto un mayor número de embriones viables.

### Conclusión

Después de todo lo dicho hasta ahora y todo lo que podemos leer en artículos, escuchar en los Congresos y charlas, creo que cuando nos planteamos en el laboratorio que sistemas queremos utilizar para mantener en cultivo a “nuestros” embriones, debemos buscar todos aquellos que, proporcionándonos comodidad, seguridad y facilitándonos el trabajo, nos permitan mejorar día a día la calidad de los embriones generados y así aumentar nuestras tasas de embarazo año tras año. La clave para conseguir todo esto se encuentra en una mejora continua de los medios de cultivo, en la evolución de los tipos de placas que vamos a utilizar, unos futuros incubadores que nos permitan observar el desarrollo de los embriones sin casi necesidad de abrirlas y unos prácticos, pero estrictos, controles de calidad dentro del laboratorio.

### Bibliografía

- Ali J, Shahata MAM, Al-Natsha SD. Formulation of protein-free medium for Human Assisted Reproduction. Hum Reprod.2000; 15:145-56.
- Alikani M, Calderón G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. Hum Reprod 2000; 15:2634-43.
- Almagor M, Bejar C, Kafka I, Yaffe H. Pregnancy rates after communal growth of preimplantation human embryos in vitro. Fertil Steril 1996; 66:394-7.
- Baladan B, Urman B, Alatas C, et al. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. Fertil Steril 2001; 75:514-8.
- Baladan B, et al. Improved embryo development with the G5 series- comparison between G5 and GIII series. American Hospital of Istanbul, Turkey. Data on file 2007. WWW.vitrolife.com
- Blake DA, Proctor M, Johnson NP. The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a Cochrane review. Hum Reprod 2004; 19:795-807.
- Byatt-Smith JG, Leese HJ, Gosden RG. An investigation by mathematical modelling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. Hum Reprod 1991; 6:52-7.
- Coroleu B. La maduración in vitro de ovocitos, una alternativa a tener en cuenta. Revista Iberoamericana de Fertilidad 2006; 23:141-2.

- Dorado M, Marques de Oliveira N, Lorenzo C, Vazquez G, Marco Y. Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de Reproducción Asistida. Revista Iberoamericana de Fertilidad. Vol. 23 nº 1 Enero-febrero 2006.
- Dumoulin J, Meijers C, Bras M, Coonen E, Geraedts J, Fuers J. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. Hum Reprod 1999; 14:465-9.
- Emiliani S, Delbaere A, Vannin A, et al. Similar delivery rates in a selected group of patients, for day 2 and day 5 embryos both cultured in sequential medium: a randomized study. Hum Reprod 2003; 18:2145-50.
- Fujita T, Uneki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K. Effect of group culture and embryo culture conditioned medium on development of bovine embryos. J of Repro and Develop 2006; 52:137-42.
- Gardner DK, Lane MW, Calderón I, Leeton J. Environment of the preimplantation embryo in vivo: metabolite analysis of the oviduct and uterine fluids during menstrual cycle and metabolism of cumulus cells. Fertil Steril 1996; 65:349-53.
- Gardner DK, Lane MW, Lane M. Development of the inner cell mass in mouse blastocysts is stimulated by reducing the embryo incubation ratio. Hum Reprod 1997; 12:182-3.
- Gardner DK. Changes in requirements and utilisation of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology 1998; 49:83-102.
- Gardner DK, Lane MW, Lane M. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. Mol Reprod Dev 2000; 57:256-61.
- Gardner DK, Lane M. Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution of sequential media. Elsevier science 2002; pp:187-213.
- González-Utor AL, Hurtado de Mendoza MV, Cascales O, et al. Efecto de la concentración de oxígeno en el cultivo embrionario. 3er Congreso ASEBIR 2005; Zaragoza, España. P.17.
- Karagenc L, Sertkaya X, Ciray N, Ulugu V, Bahçeci M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. Reprod Biomed Online 2004; 9:409-17.
- Kolibianakis E, Zikopoulos K, Verpoest W, et al. Should we advise patients undergoing IVF to start a cycle leading to a day 3 or a day 5 transfer?
- Kolibianakis Stratis. Day 5 embryo transfer does not enhance reproductive outcome compared to day 3 transfer using the current culture systems. Pre-congress course program of 27 June. In vitro culture conditions for human gametes and embryos: Present and future. Special Interest Groups "Embryology". ESHRE 2004 Berlin-Germany.
- Lane M, Gardner DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. Hum Reprod 1992; 7: 558-62.
- Leese HJ. Metabolic requirements of the early embryo. Pre-congress course program of 27 June. In vitro culture conditions for human gametes and embryos: Present and future. Special Interest Groups "Embryology". ESHRE 2004 Berlin-Germany.
- Levron J, Shulman A, Bider D, et al. A prospective randomized study comparing day 3 with blastocyst-stage embryo transfer. Fertil Steril 2002; 77:1300-1.

- Macklon NS, Pieters MHEC, Hassan MA, et al. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Hum Reprod* 2002; 17:2700-5.
- Milki AA, Hincley MD, Fish JD, et al. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000; 73:126-9.
- Ménézo Y, Hamamah S, Hazout A, Dale B. Time to switch from co-culture to sequential defined media for transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod*.1998; 13:2043-4.
- Moessner J, Dobson WC. The quality of human embryo is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *Fertil Steril* 1995; 64:1034-5.
- O'Neill C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vivo. *Hum Reprod* 1998; 13:1303-9.
- Papanicolau EG, D'Haeseleer E, Verheyen G, et al. Live birth rate is significantly higher after blastocysts transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 2005, 20:3198-203.
- Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and the role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4756-60.
- Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, et al. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril* 2000; 73:558-64.
- Rijnders PM, Jansen CAM. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 1999; 14:2333-7.
- Sepúlveda S, García J, Arriaga E, Noriega L, Wiemer KE, Rieger D. Comparison of single medium with sequential media for culture of sibling human embryos to the blastocyst stage. *Proc Mediterr Soc Reprod Med*. 5<sup>th</sup> Ann. Meeting, p56 (OP-20).
- Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellans S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007; 22:230-46.
- Rienzi L, Ubaldi F, Iacobeli M, Ferrero S, Minaci MG, et al. Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002; 17:1852-5.
- Rinaudo P. Influencia del cultivo embrionario en la expresión génica. Symposium sobre Reproducción Asistida. Fundación Tambre; 2006 Madrid, España.
- Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K, et al. Effects of embryo density and co-culture of unfertilised oocytes on embryonic development of in vitro fertilized mouse oocytes. *Hum Reprod* 1995; 10:2382-5.
- Spyropoulou I, Karamalegos C, Bolton UN. A prospective randomized study comparing the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2. *Hum Reprod* 1999; 14:76-9.

## DEBATE: DIFERENTES MÉTODOS DE CULTIVO EMBRIONARIO

Nicolás Prados

Equipo IVI Sevilla. Sevilla. Correo electrónico: [nprados@ivi.es](mailto:nprados@ivi.es)

Aunque llevamos más de 20 años cultivando embriones humanos *in vitro*, todavía no están establecidas unas condiciones óptimas y universales para su cultivo. El embrión humano ha demostrado una gran vitalidad y es capaz de crecer con éxito en medios de diferente composición y en distintas condiciones de cultivo. En esta sesión resaltaremos *sólo* algunos de los muchos aspectos que varían hoy día entre los distintos laboratorios de embriología clínica del mundo.

### El momento de la transferencia

Se han transferido con éxito desde cigotos (e incluso los gametos) hasta blastocistos completamente eclosionados. La transferencia en la etapa de blastocisto implica cultivar *in vitro* los embriones hasta el día 5<sup>o</sup> o 6<sup>o</sup> de desarrollo (cultivo largo). Aunque existe una tendencia hacia la transferencia de un único blastocisto todavía no es la técnica más utilizada y habitualmente los embriones se transfieren en el 2<sup>o</sup> o 3<sup>er</sup> día de desarrollo (cultivo corto).

Las ventajas de la transferencia de blastocisto según sus defensores serían principalmente (Gardner, 2006): identificar mejor el potencial embrionario tras su activación genómica; sincronizar el estadio del embrión con el del lugar al que son transferidos minimizando la exposición al ambiente hiperestimulado y las contracciones uterinas; obtener tasas de implantación más altas y mejorar los resultados clínicos, y obtener embriones que tienen mayor supervivencia a la criopreservación.

Es cierto que en la última revisión de la Cochrane de 2005 afirma que no existen suficientes indicios para afirmar que el cultivo largo ofreciese mejores resultados gestacionales, pero los diferentes estudios no eran equivalentes en las comparaciones (Blake et al., 2005). Los últimos trabajos publicados parecen que pueden cambiar estas conclusiones. El enfoque del cultivo largo debe ser la búsqueda del mejor embrión y la tendencia a valorar el resultado final positivo de un ciclo de reproducción asistida es el nacimiento de un niño sano. En el reciente trabajo randomizado del grupo de Devroey la probabilidad de tener un niño sano en casa por inicio de estimulación era un 50% mayor (56% frente a 38%) tras la transferencia de un blastocisto (Papanikolaou et al., 2006).

Son estudios como éste, prospectivos randomizados dentro de la misma población los que van a dilucidar si realmente se obtiene un beneficio real con el cultivo largo.

Es posible que los dos factores que más nos inquieten sean cada vez de menor impacto. Las tasas de implantación con blastocistos parecen que en las mismas condiciones son más altas y las tasas de formación de blastocistos no son bajas en estos casos, con lo que parece que el laboratorio no es tan deletéreo para el embrión y podría ser tan buen incubador como el útero. El segundo factor es la congelación de los blastocistos. Existen ya grupos que tanto con la congelación lenta (Veeck et al., 2004) como con la vitrificación (Stehlik et al., 2005), están consiguiendo resultados interesantes y mejores que con embriones de día 3.

El cultivo largo es complicado y como toda técnica no es aplicable a todas las parejas y cada laboratorio tiene que ponerla a punto. El interés en el cultivo largo está aumentando además con la transición a la transferencia del embrión único. Si creemos realmente en que un embarazo múltiple no es un éxito y que es evitable, debemos optimizar el cultivo largo, pues es el que nos permite continuar seleccionando el mejor embrión. Tendremos por tanto que optimizar las condiciones de cultivo largo; probablemente (salvo excepciones) todas las pacientes menores de 37 años con buena respuesta y especialmente en un primer ciclo serán candidatas a la transferencia de un único blastocisto.

#### Condiciones de cultivo

El cultivo *in vitro* de embriones y su transferencia se hace en numerosos mamíferos de forma tanto rutinaria como experimental y muchos de sus aspectos se tratan de extrapolar al cultivo *in vitro* de embriones humanos. Por ejemplo, se está proponiendo por parte de algunos autores el cultivo bajo tensiones bajas de oxígeno, más parecidas a las fisiológicas. Estas condiciones mejoran no sólo el desarrollo de los embriones sino la maduración *in vitro* de ovocitos o el aislamiento de células madres embrionarias.

El hecho de que los embriones humanos y de ratón puedan crecer a concentraciones atmosféricas de oxígeno no significa que sea la condición óptima para su crecimiento. La concentración de oxígeno en las trompas de los mamíferos oscila entre el 2 y el 8% siendo siempre menor en el útero (entre 1 y 5%). Por un lado está el ejemplo práctico de que en especies más sensibles es necesario cultivar los embriones *in vitro* en atmósferas por debajo del 10%. Por otro lado estudios en ratón demuestran como el metabolismo en tensiones atmosféricas de oxígeno es mucho más estresante para las mitocondrias y de hecho la glucosa se consume menos y se produce glicólisis anaeróbica. Aunque morfológicamente no hay grandes diferencias entre los blastocistos en uno u otro medio el metabolismo del embrión es aparentemente más correcto a bajas tensiones de oxígeno (Dumoulin et al., 1999; Petersen et al., 2005). No parece haber diferencias durante el cultivo corto (Bahceci et al., 2005) o son pequeñas (Kea et al., 2007).

Es complejo y costoso cultivar a tensiones bajas de oxígeno. Hace falta gastar volúmenes altos de nitrógeno para desplazar el oxígeno del incubador o usar mezcla de gases en incubadores de muy poco

volumen. El cultivo clásico en incubadores de gran volumen lleva aparejadas una serie de inconvenientes que pueden hacer ineficaz el cultivo a baja tensión de oxígeno (Fujiwara et al., 2007). Una tercera vía sería aumentar la concentración de antioxidantes en el medio si el efecto pernicioso del oxígeno fuera únicamente un aumento de especies reactivas de oxígeno (Burton et al., 2003). Algunos medios comerciales están comenzando a incluirlos.

Podemos concluir que a corto plazo no será una técnica habitual, pero tendremos que tenerlo en cuenta si queremos seguir optimizando el laboratorio (Agarwal et al., 2006).

También se ha propuesto el cultivo agrupado para favorecer la acción paracrina de moléculas excretadas por los embriones. El cambio de cultivar de pocillo a microgota fue tanto por comodidad y economía como la observación de que los embriones agrupados o en volúmenes pequeños crecían mejor. Existen autores que afirman que podemos obtener beneficios extra cultivando embriones agrupados además de cultivar en volumen pequeño y existen casas comerciales que lo recomiendan para sus medios. Este agrupamiento sólo tiene sentido en el cultivo largo cuando tras un primer descarte de embriones no viables en día 3, podemos agruparlos puesto que el principal punto de corte será la calidad en el quinto día de desarrollo. Aunque sea habitual en la reproducción animal, realmente no existen estudios prospectivos randomizados en clínica humana que apoyen o descarten esta técnica pero tampoco hay razones para no realizarlos.

#### Medios de cultivo

Existen numerosas casas comerciales que ofrecen medios de distinta composición. Hay laboratorios que fabrican sus propios medios de cultivo. Hasta ahora ningún medio ha destacado claramente sobre los demás. Debido a la imposibilidad de hacer experimentos con un material tan valioso como es el embrión humano se deben hacer extrapolaciones a partir de la experiencia de la reproducción asistida animal, pero nunca debemos olvidar que el embrión humano está a su vez adaptado a un ambiente distinto al de los modelos empleados.

Tras los primeros medios que se usaron, que no eran muy fisiológicos (EBSS) o eran muy simples (HTF), se han ido desarrollando medios comerciales más o menos complejos que han tratado de adaptarse a las tres fases de necesidades metabólicas que nos encontramos en el laboratorio: espermatozoides y células del complejo ovocito-cúmulo (presencia de glucosa), el embrión desde el estadio de cigoto hasta el 3<sup>er</sup> día (presencia de piruvato, lactato) y desde el 3<sup>o</sup> en adelante (glucosa junto a una mayor presencia de aminoácidos, vitaminas y otra serie de metabolitos). Los distintos medios comerciales presentan variaciones de composición dentro de estas líneas generales.

Dentro de la versatilidad del embrión humano hay autores que afirman que es posible dejar elegir al embrión y mantenerlo durante todo su cultivo (desde el cigoto hasta el blastocisto) en el mismo medio y que el embrión es capaz de tomar y excretar lo que necesita en cada momento (Biggers et al.,

2005). Esta es la base del medio K-SOM que ha derivado también en una línea de medios comerciales para cultivo *in vitro* humano. Según estos autores, una de las ventajas de este medio es que evita un cambio brusco en la composición del medio que presentan los medios secuenciales: justo cuando el embrión está activando su genoma y se está adaptando al medio se traspasa bruscamente a otro de una composición distinta.

Una hipótesis interesante que se ha propuesto es la de que el metabolismo del embrión humano debería mantenerse bajo (Eles, 2002). Si el medio de cultivo es demasiado rico el embrión crecerá aceleradamente adaptándose a ese ambiente y activando una serie de cascadas génicas que van a afectar negativamente su desarrollo. En esta hipótesis además se insiste en que el ratón no es un buen modelo ya que tiene el ovocito tiene un volumen menor con menos reservas y activa antes su metabolismo y su genoma. Muchos de las innovaciones y características de los medios se extrapolan actualmente de la experiencia con embriones de ratón. Se debe buscar un medio que se parezca lo más posible al ambiente relativamente pobre de la trompa humana y ser cautos en cuanto a la experiencia en otras especies.

Uno de los ejemplos más claros de la versatilidad del embrión humano y su diferencia a otros modelos animales es que todavía se usa con éxito un medio tan simple como es el HTF suplementado con suero materno. Este medio, al igual que el resto, debe suplementarse con albúmina sérica (HSA). La albúmina tiene una serie de utilidades, prácticas (para el manejo del embrión) y de cultivo (tampón osmótico y detoxificación). La albúmina se puede utilizar comercialmente purificada o recombinante o incluida en el suero materno de la paciente. Hay autores que sostienen que no se debe usar el suero materno ya que contiene muchos factores (lípidos, proteínas, hormonas, vitaminas) que no controlamos y que podrían ser tóxicos, que el embrión nunca se ve expuesto al suero como tal ya que es un producto artificial de laboratorio tras la coagulación del plasma y que en rumiantes, por ejemplo, el suero provoca graves enfermedades en el desarrollo de los fetos (Gardner and Lane, 2000). Si bien esto es cierto, la albúmina comercial se purifica a partir de una serie de precipitaciones con solventes y sales posiblemente embriotóxicos y su forma final tiene estabilizadores que no han sido bien estudiados todavía si tienen un efecto o no. También cabe decir que cualquier medio comercial es igualmente poco fisiológico pues todavía desconocemos la composición exacta en las trompas y que a diferencia de los embriones de rumiantes ya han nacido muchos niños sanos a partir de estos medios. Probablemente el uso del suero materno se vea descartado completamente con el tiempo debido a una necesidad de controlar y homogenizar las condiciones de cultivo de todos los embriones.

#### Control de calidad

Una de los aspectos más importantes dentro del laboratorio y que poco a poco se está afianzando es el desarrollo de un control de calidad integral del laboratorio de embriología clínica (Keck, 2003; Mortimer and Mortimer, 2005). Esto afecta no sólo a los productos comerciales que se adquieren para

su uso en el laboratorio, sino también a todos los aparatos y protocolos que se usan, además de lo que se prepare de forma interna para su uso en el laboratorio.

Los elementos que se preparan de forma casera (medios, pipetas, material de vidrio, etc.) deben prepararse según las normas clínicas habituales con control de esterilidad y pirógenos. Específicos de embriología son las pruebas de supervivencia espermática y el cultivo de blastocisto de ratón. Este último es muy susceptible a la estirpe utilizada (Gardner et al., 2005).

Además al igual que las casas comerciales tiene sus certificados de calidad, el laboratorio de FIV también debe aspirar a tenerlo. Debe existir un grupo control o centinela sobre el que analizar y revisar cada cierto tiempo los resultados de gestación, implantación y recién nacido único y sano de los distintos aspectos del laboratorio. Todos los protocolos de trabajo deben estar por escrito, extensamente y con las posibles contingencias planteadas. Debe existir una base de datos que almacene toda la información de manera que sea fácilmente accesible y auditable. Los aparatos deben estar revisados y verificados o calibrados si fuera necesario, y esta información recogida junto a su trazabilidad y las instrucciones necesarias. El personal debe reciclarse continuamente y controlar que se evalúan los embriones de la misma manera, etc.

El desarrollo de un programa de calidad puede mejorar los resultados del laboratorio mucho más que la introducción de una nueva técnica o un nuevo equipamiento. En realidad estamos evitando los momentos en los que inconscientemente haríamos algo inadecuado (por acción o por omisión) que afectaría al cultivo de los embriones.

Probablemente dentro de diez años la forma de cultivar los embriones, el medio de cultivo y el mismo laboratorio habrá cambiado tanto como desde hace diez años hasta ahora.

Tal vez se desarrollen medios complejísimos que incluyan factores de crecimiento e incubadores y sistemas de dosificación continua de medio en microplaca que permitan un sistema de cambio de medio gradual.

Probablemente consigamos las condiciones óptimas de cultivo que incluso mejoren las que el embrión pueda encontrar en el útero antes del sexto día de desarrollo. Apoyándonos en los trabajos en embriones y células madre de mamíferos podremos ir mejorando las condiciones de cultivo, siempre con el cuidado y la salvedad que no todo es extrapolable.

### Bibliografía

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 2006; 86:503-12.

Bahceci M, Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F. Effect of oxygen concentration during the incu-

- bation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11:438-43.
- Biggers JD, McGinnis LK, Lawitts JA. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Hum Reprod* 2005 D20:3376-84.
- Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD002118.
- Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod Biomed Online*. 2003; 6:84-96.
- Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod* 1999; 14:465-9.
- Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, Duan YR, Kazono M, Kimura F, Noda Y. Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:5-9.
- Gardner DK, Balaban B. Choosing between day 3 and day 5 embryo transfers. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49:85-92.
- Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. In *Handbook of In Vitro Fertilization* by AO Trounson, DK Gardner. CRC Press, 2000, Nueva York.
- Gardner DK, Reed L, Linck D, Sheehan C, Lane M. Quality control in human in vitro fertilization. *Semin Reprod Med* 2005; 23:319-24.
- Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007; 87:213-6.
- Keck C. *Quality Management in Assisted Reproduction*. Serono Symposia International. Kap Cz; 2003, Brno.
- Leese HJ. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *Bioessays* 2002; 24:845-9.
- Mortimer D, Mortimer ST. *Quality and Risk Management in the IVF Laboratory*. 2005. Cambridge University Press. Cambridge.
- Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006 16; 354:1139-46.
- Petersen A, Mikkelsen AL, Lindenberg S. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005; 84:1181-4.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:53-7.
- Veeck LL, Bodine R, Clarke RN, Berrios R, Libraro J, Moschini RM, Zaninovic N, Rosenwaks Z. High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertil Steril* 2004; 82:1418-27.

## MÉTODOS DE FIJACIÓN DE BLASTÓMERAS TRAS BIOPSIA EMBRIONARIA

**Carmen Rubio, Amparo Mercader, Pilar Buendía y Arantxa Delgado**  
Instituto Universitario – IVI, Valencia. Correo electrónico: c.rubio@ivi.es

Tras la biopsia embrionaria se realiza la fijación del núcleo de cada uno de los blastómeros, de modo que se eliminen los restos de citoplasma por completo y los núcleos mantengan su integridad y morfología. La fijación es un paso decisivo en todo el proceso ya que la calidad de las extensiones va a condicionar el acceso de las sondas de DNA al núcleo y de ello dependerá la eficiencia de hibridación y la fiabilidad del diagnóstico. Existen diferentes métodos de fijación, tomados de la citogenética clásica, y el más utilizado es el de Tarkowski, aunque existen otros protocolos modificados.

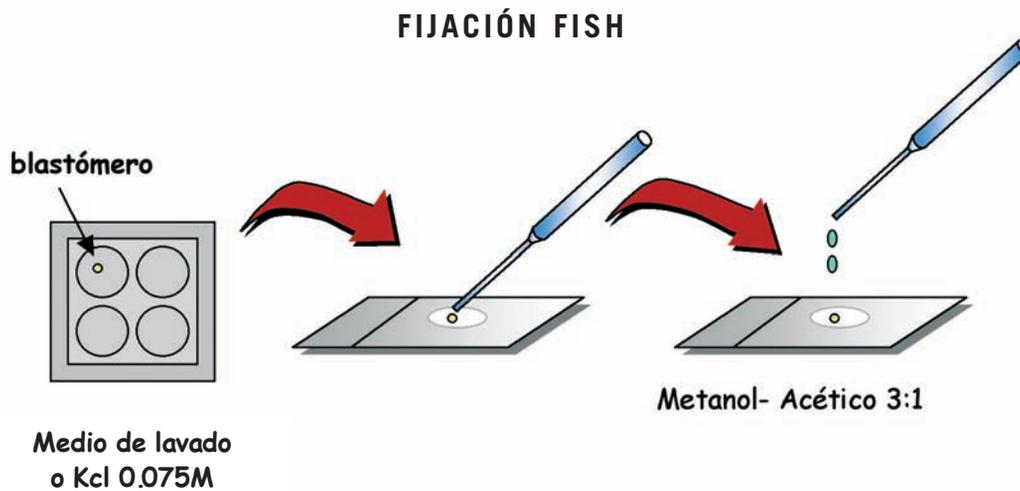
La fijación se puede realizar bajo lupa estereoscópica o microscopio invertido con objetivo de contraste de fases de 10x. Nuestro protocolo de fijación modificado se detalla a continuación

1.- Aspirar el blastómero con una pipeta Pasteur estirada a la llama y colocarlo en un pocillo con 0,5 ml de medio de cultivo tamponado con albúmina al 5% (lupa estereoscópica). Otra posibilidad incluye un tratamiento hipotónico previo en una solución de cloruro de potasio (KCl 0,075N), durante 1 minuto aproximadamente. La célula aumenta su volumen y ello facilita su extensión y la posterior eliminación de los restos de citoplasma.

2.- Aspirar de nuevo el blastómero con una pipeta Pasteur estirada a la llama diferente a la anterior y depositarlo sobre un portaobjetos previamente desengrasado. Retirar cuidadosamente el exceso de medio depositado y valorar la expansión del blastómero sobre el portaobjetos.

3.- Dejar secar el medio y luego dejar caer verticalmente sobre la extensión una primera gota de la solución de fijación *Carnoy* (metanol-acético 3:1) y cuando ésta se retrae, añadir una segunda gota de fijador (microscopio invertido, contraste de fases 10x).

4.- Continuar añadiendo solución de fijación hasta que se eliminen los restos de



## Bibliografía

- Dozortsev DI, McGinnis KT. An improved fixation technique for fluorescence in situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2001; 76(1):186-8.
- Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994; 9(4):721-4.
- Tarkowski AK: An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966; 5: 394-400.
- Velilla E, Escudero T, Munne S. Blastomere fixation techniques and risk of misdiagnosis for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2002; 4(3):210-7.
- Xu K, Huang T, Liu T, Shi Z, Rosenwaks Z. Improving the fixation method for preimplantation genetic diagnosis by fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(9):570-4.

## ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y CITOQUÍMICO DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO DE OVOCITOS HUMANOS

Irene Mondéjar<sup>1</sup>, María Jiménez Movilla<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Teresa Castells<sup>1</sup>, Manuel Avilés<sup>1</sup>, José Ballesta<sup>1</sup>, Pedro José Fernández-Colom<sup>2</sup> y Alberto Romeu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. <sup>2</sup>Servicio de Ginecología. Área de reproducción humana. Hospital Universitario La Fe de Valencia. Correo electrónico: [irenemc@um.es](mailto:irenemc@um.es)

### Introducción

El retículo endoplasmático (RE) consiste en una red membranosa tridimensional que se encuentra presente en el citoplasma de los diferentes tipos celulares que delimita un único espacio luminal. El RE interviene en funciones relacionadas con la síntesis y glicosilación proteica, metabolismo de lípidos y detoxificación de diferentes productos (Baumann and Walz, 2001; Voeltz et al., 2002; Coopers, 2007). El RE está especialmente desarrollado en las células que están implicadas activamente en la síntesis de proteínas, fundamentalmente proteínas de secreción (Baumann and Walz, 2001). Además, se ha visto que el RE actúa como un depósito intracelular de iones calcio, participando en la homeostasis de este catión (Papp et al., 2003). El calcio está implicado en diferentes procesos de gran importancia fisiológica. Así, el proceso de la fecundación es un proceso dependiente de calcio siendo de gran trascendencia el papel que juega este catión en la activación del ovocito especialmente en la reanudación de la meiosis y en la liberación de los gránulos corticales en el proceso conocido como reacción cortical. El calcio juega igualmente un papel crucial en la regulación de las sucesivas divisiones mitóticas durante la segmentación embrionaria (Parekh and Putney, 2005).

El RE posee una compartimentalización funcional muy heterogénea que se encuentra mantenida por señales externas a él (Levine and Rabouille, 2005). Podemos distinguir dos dominios principales con distinta morfología que se corresponden con la envoltura nuclear y el RE periférico (Baumann and Walz, 2001; Voeltz et al., 2002). Adicionalmente, en el RE periférico podemos distinguir dos regiones morfológicamente diferentes, rugoso y liso, atendiendo a la presencia o no de ribosomas adheridos a su membrana. La presencia de los ribosomas le confiere una morfología ultraestructural rugosa de la que procede su nombre (Baumann and Walz, 2001; Voeltz et al., 2002; Coopers, 2007).

En un estudio ultraestructural previo se ha descrito la existencia de unas estructuras en el ooplasma de ovocitos humanos con características morfológicas típicas del RER en los folículos antrales de pequeño tamaño (Satanathan, 1994). Estos autores en otro estudio han descrito que este RER se encuentra ausente en ovocitos maduros; sin embargo, este típico RER se muestra de nuevo patente en embriones humanos en el estadio de ocho células (Satanathan, 1997).

Estudios citoquímicos realizados recientemente mediante el uso del microscopio confocal en combinación con el uso de anticuerpos específicos contra proteínas presentes en el RE demuestran la exis-

tencia de este orgánulo en los ovocitos humanos en metafase II (Balakier et al., 2002). Estos estudios, ultraestructurales y citoquímicos con microscopía confocal, descritos previamente son aparentemente contradictorios. En un estudio citoquímico ultraestructural hemos descrito la presencia de unas vesículas de contenido electrodensito con un marcaje específico para un marcador del RER en los ovocitos de ratón contenidos en folículos ováricos de tamaño superior al folículo ovárico multilaminar (Jiménez-Movilla, 2005; Jiménez-Movilla et al., 2005, Hoodbhoy et al., 2006). Este RER vesicular es de morfología atípica.

Por todo lo expuesto anteriormente en el presente estudio será analizada la existencia y estructura del RER de ovocitos humanos con técnicas citoquímicas empleando anticuerpos específicos a nivel ultraestructural y con microscopía confocal.

## Material y métodos

### Obtención de ovocitos

Los diferentes ovocitos humanos fueron obtenidos de pacientes incluidas en el programa de fecundación *in vitro* del Hospital Universitario "La Fe" de Valencia, las cuales fueron sometidas a un tratamiento de estimulación con FSH hasta el día de la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Entre 24 y 36 horas después de la administración de la hCG, los ovocitos fueron obtenidos mediante punción-aspiración folicular por vía vaginal guiada por ultrasonidos. La donación de estos ovocitos fue realizada bajo el consentimiento de todos los participantes.

En este estudio se usaron ovocitos en vesícula germinal (VG), metafase II (MII) y ovocitos procedentes de fecundación anómala o cigotos anormales. Los ovocitos MII fueron inseminados pero no fueron fecundados. En cuanto a los cigotos anormales se usaron 5, de los cuales 3 son de un solo pronúcleo tras la ICSI y los otros dos ovocitos poseen dos y tres pronúcleos tras tres y dos días de cultivo tras la fecundación.

### Análisis inmunocitoquímico mediante microscopía confocal

En este estudio se han usado dos anticuerpos específicos que reconocen dos proteínas que se encuentran presentes en el RER. Una de las proteínas analizadas es el enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI) que es una proteína localizada en el lumen del RER responsable de la formación de los puentes disulfuro entre los aminoácidos cisteína participando en el correcto plegamiento de las proteínas que se sintetizan en el RER (Ellgaard and Ruddock, 2005). Otra proteína analizada es la calnexina que es una chaperona que se encuentra anclada en la membrana del RER (Ellgaard et al., 1999; Williams, 2006). La identificación y localización del RER se realiza mediante técnicas inmunocitoquímicas usando marcadores fluorescentes. Para ello, los ovocitos en VG (n=2) y MII (n=13) fueron fijados con paraformaldehído al 2% en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los ovocitos fueron lavados tres veces con PBS durante 5 minutos en cada lavado. Las muestras se incuban durante 15 minutos en PBS que contiene 50 mM de glicina y posteriormente se incuban por un periodo de 10 minutos con PBS suplementado con 0,1% de

saponina para permeabilizar estas células. Para la visualización de la unión antígeno-anticuerpo se usaron técnicas inmunocitoquímicas indirectas de dos capas que se describen a continuación.

Para el estudio de la proteína PDI, los ovocitos en VG (n=2) y MII (n=7) son incubados con el anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de ratón anti-PDI (1:1000) (Stressgen) diluido en PBS-0,1% BSA acetilada durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados sucesivos de cinco minutos cada uno en tampón PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario, un anticuerpo policlonal anti-IgG producido en carnero conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (1:400) diluido en PBS-0,1% BSA acetilada durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las muestras se lavan varias veces en PBS en oscuridad.

Para el estudio de la proteína calnexina, un ovocito en VG y un ovocito en MII se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-calnexina (Stressgen) producido en conejo (1:1000) diluido en PBS-0,1% BSA acetilada, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar en PBS, los ovocitos fueron incubados con el anticuerpo secundario, anticuerpo policlonal anti-IgG producido en carnero conjugado con el fluorocromo TRICT (Sigma) (1:300) en PBS-0,1% BSA acetilada, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Se realizaron igualmente estudios de colocalización de la proteína PDI y calnexina en ovocitos en MII (n=4). Para ello, los ovocitos fueron incubados en primer lugar con el anticuerpo anti-PDI y posteriormente con el anti-calnexina en las condiciones descritas previamente. Se realizaron los correspondientes controles de la técnica. Para ello, se procede a la sustitución del anti-PDI y anti-Calnexina por el correspondiente tampón (PBS-0,1% BSA acetilada) manteniendo el resto de las condiciones del experimento.

Posteriormente las muestras se lavan varias veces en PBS y se procede al montaje en portaobjetos sin oprimir las muestras para mantener la morfología esférica de los ovocitos. Las muestras fueron analizadas bajo un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS.

#### Análisis inmunocitoquímico mediante microscopía electrónica de transmisión

Los ovocitos en VG (n=4), MII (n=5) y los cigotos anormales con uno o varios pronúcleos (n=5), procedentes de fecundación anómala, fueron fijados en glutaraldehído al 0,5% en tampón cacodilato al 0,1M a pH 7,4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, tras lavar en tampón cacodilato las muestras son incluidas en la resina LR-White. El uso de esta resina permite una buena conservación de la ultraestructura de las diferentes organelas al mismo tiempo que preserva los antígenos para su detección mediante técnicas citoquímicas (Newman, 1989). Una vez procesadas e incluidas las muestras, se realizan secciones ultrafinas que se depositan en rejillas de níquel (100 mesh) cubiertas de una película de Formvar.

Para la visualización de la unión antígeno-anticuerpo a nivel ultraestructural se emplean partícu-

las de oro coloidal (15 nm) como marcador citoquímico. Las técnicas inmunocitoquímicas empleadas se basan en un método indirecto de dos capas para el anticuerpo anti-calnexina y de tres capas para el anticuerpo anti-PDI. Estas técnicas se describen brevemente a continuación. Para la detección de calnexina, las secciones ultrafinas fueron incubadas en PBS-1% BSA durante 10 minutos y posteriormente se incuban con el anticuerpo primario anti-calnexina producido en conejo (1:1000) diluido en PBS-1%BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados en PBS las rejillas se incuban con proteína A conjugada con oro coloidal (1:65) diluida en PBS-1%BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la detección de la proteína PDI, las rejillas fueron incubadas con PBS-1% BSA durante diez minutos y después con el anticuerpo primario anti-PDI (1:1000), anticuerpo monoclonal producido en ratón, diluido en PBS-1%BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de tres lavados sucesivos de cinco minutos cada uno en tampón PBS las rejillas se incubaron con el anticuerpo secundario, un anticuerpo policlonal producido en conejo (1:400) diluido en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar varias veces en PBS, como hemos mencionado anteriormente, las rejillas se incuban finalmente con proteína A conjugada con oro coloidal (1:65) en PBS-1%BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las rejillas en tampón PBS y con agua destilada, se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones ultrafinas fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1011 dotado de cámara fotográfica digital.

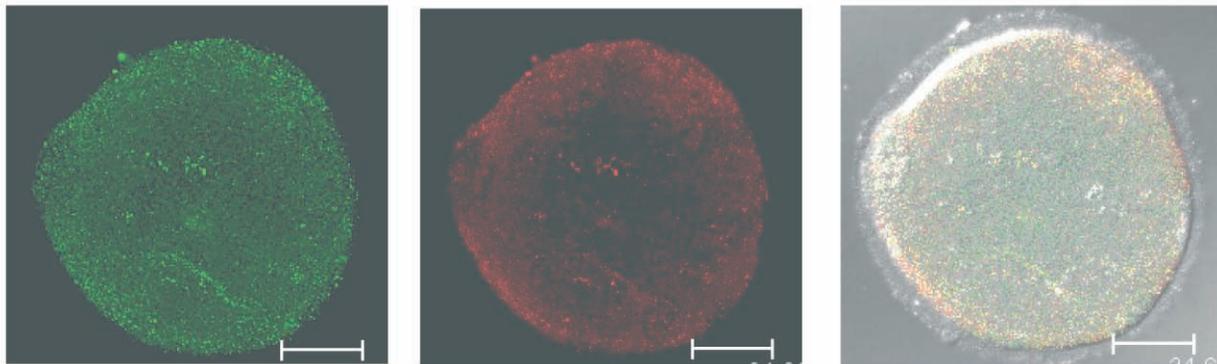
Se procedió igualmente a la realización de un análisis de imagen de las vesículas específicamente inmunomarcadas con el anticuerpo anti-PDI. En este estudio se evaluó el diámetro de las vesículas y para ello se usaron las regiones representativas fotografiadas con el microscopio electrónico de transmisión siendo analizadas mediante el procesador de imagen. Un total de 578 vesículas fueron medidas, 62 proceden de ovocitos en VG, 276 de ovocitos en MII y 240 de zigotos anormales. Para el análisis comparativo del tamaño de las vesículas de las diferentes muestras se usa el test estadístico Anova y el test *post hoc* de Bonferroni ambos con una  $P < 0,05$ .

## Resultados

### Microscopía confocal

Tanto en los ovocitos en VG como los ovocitos en MII se observa un patrón de inmunofluorescencia homogéneo de forma puntiforme por todo el citoplasma ovocitario utilizando el anticuerpo anti-PDI (Fig. 1a). Cabe destacar que en los ovocitos en VG se observa una región libre de marcaje que se corresponde con la vesícula germinal. La inmunotinción detectada usando el anticuerpo anti-calnexina fue similar a la descrita para el anticuerpo anti-PDI (Fig. 1b). En los ovocitos donde se ha realizado dobles marcajes para determinar la ubicación de ambas proteínas en el ooplasma se observa que

mayoritariamente PDI y calnexina colocalizan (Fig. 1c). Sin embargo, se observan pequeñas variaciones en el patrón de distribución de ambas proteínas. En algunos ovocitos la proteína calnexina se encuentra distribuida de un modo preferente en la región cortical y en otros en la región central siendo la distribución de PDI uniforme por todo el ooplasma. No se observó inmunomarcaje inespecífico con los diferentes controles negativos usados.



**Figura 1.** Ovocito en Metafase II analizada mediante microscopía confocal (MII). (a) Anticuerpo anti-PDI. Se observa una distribución uniforme y puntiforme en el ooplasma. (b) Anticuerpo anti-calnexina. Se observa una distribución de la inmunofluorescencia similar a la observada con el anticuerpo anti-PDI. (c) En esta figura aparece una imagen combinada del marcaje obtenido con el anticuerpo anti-PDI y anti-calnexina. Se observa colocalización en las zonas que aparecen en amarillo.

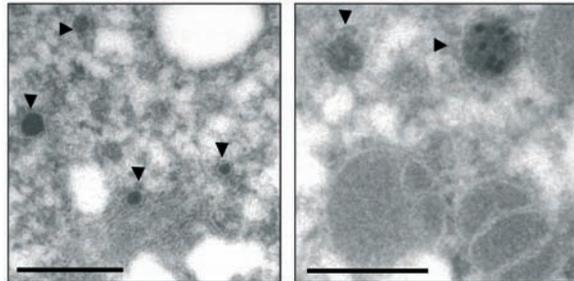
#### Microscopía electrónica de transmisión

El estudio ultraestructural de los diferentes ovocitos muestra la presencia de unas vesículas de pequeño tamaño con un contenido muy electrodensito (Fig. 2a, 3a y 4a). Estas vesículas se encuentran distribuidas de un modo homogéneo por todo el ooplasma. La aplicación de técnicas inmunocitoquímicas usando como marcador el oro coloidal mostró un alto y específico inmunomarcaje con el anticuerpo anti-PDI en estas vesículas (Fig. 2b, 3b y 4b). En cambio el inmunomarcaje fue prácticamente ausente en los grandes agregados tubulares de RE liso rodeado por mitocondrias. Las células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida de los ovocitos humanos mostraron un patrón de unión del anticuerpo anti-PDI en estructuras subcelulares rodeadas de membrana con aspecto tubular y con numerosos ribosomas. Esta morfología se corresponde con el típico RER. Sin embargo, no se observó inmunomarcaje con el anticuerpo anti-calnexina en las condiciones usadas en este estudio. Este hecho se debe probablemente a la sensibilidad mostrada por algunos antígenos cuando son fijados con glutaraldehído y procesados para su estudio con el microscopio electrónico de transmisión. Los diferentes controles negativos usados no proporcionaron inmunoreactividad en ninguna zona concreta de las diferentes muestras estudiadas.

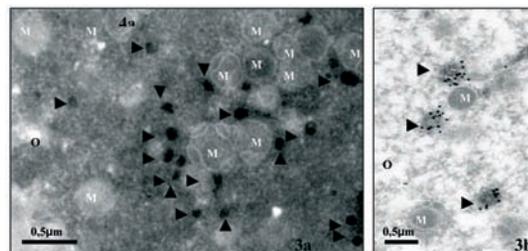
El análisis de imagen de las diferentes muestras nos revela que el diámetro medio (media  $\pm$  error estándar) de las vesículas se estima en  $107 \pm 29$ ,  $119 \pm 34$  y  $128 \pm 32$  nanómetros en los ovocitos en VG, MII y zigotos anormales. Tras realizar el correspondiente análisis estadístico se llega a la conclu-



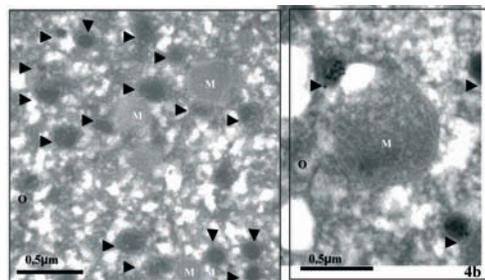
sión de que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tres grupos de estudio, existiendo una tendencia al aumento del tamaño de estas vesículas específicamente marcadas con el anticuerpo anti-PDI.



**Figura 2.** Ovocito humano en vesícula germinal (GV). (a) Sección control. No se observa inmunomarcaje. En ooplasma (O) se aprecia un aparato de Golgi (G) y vesículas electrodensas (puntas de flecha). (b) Anticuerpo anti-PDI. Véase la reactividad específica únicamente en las vesículas electrodensas (puntas de flecha). Mitocondrias (M).



**Figura 3.** Ovocito humano en Metafase II (MII). (a) Sección control. En el ooplasma se observan mitocondrias (M) y numerosas vesículas electrodensas de pequeño tamaño (puntas de flecha). (b) Anticuerpo anti-PDI. Véase la reactividad en las vesículas electrodensas (puntas de flecha). También aparecen mitocondrias (M).



**Figura 4.** (a) Ovocito humano procedente de fecundación anómala por ICSI que presenta un solo pronúcleo. Sección control incubada con el anticuerpo anti-PDI policlonal producido en conejo y proteína A conjugada con oro coloidal. En el ooplasma (O) se observan mitocondrias (M) y vesículas electrodensas (puntas de flecha). (b) Ovocito humano procedente de fecundación anómala de tres pronúcleos fijado en día más 2. Anticuerpo anti-PDI. Nótese el intenso marcateo en las vesículas (puntas de flecha). No se observa marcateo en la mitocondria lo que demuestra la especificidad de la técnica (M).

## Discusión

En los estadios finales de la oogénesis se produce el proceso de maduración ovocitaria que permite que el ovocito sea competente para poder ser fecundado. Durante este proceso se va a producir una maduración nuclear (progresión del estadio de vesícula germinal a metafase II) y una maduración citoplasmática (generación de un citoplasma que permita el desarrollo preimplantacional) (Eppig, 1996). El proceso de maduración ovocitaria puede ser producido por cambios a diferentes niveles afectando también la estructura tridimensional del RE (Kline, 2000; Fitzharris et al., 2007). Estudios realizados con microscopía confocal han demostrado cambios en la estructura del RE durante la maduración ovo-



citaria en diferentes especies incluida la especie humana (Melhmann et al., 1995; Balakier et al., 2002; Terasaki, 2004; Fitzharris et al., 2007). Algunos de estos cambios pueden ser específicos de algunas especies así los cambios producidos en la organización del RE en el ovocito de hámster, ratón y *Xenopus* consisten en la formación de unos agrupamientos corticales de RE en el ovocito en metafase II (Mehlmann et al., 1995; Kline, 2000; Fitzharris et al., 2007). Se ha descrito igualmente una redistribución de organelas y una reorganización del RE liso en los ovocitos humanos tras la fecundación (Sousa et al., 1997). El  $\text{Ca}^{2+}$  es importante para la maduración ovocitaria, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Kline, 2000; Fitzharris et al., 2003). Estudios preliminares sugieren que los cambios en las características espaciales de la propagación de la onda de calcio está relacionada con el diferente patrón de distribución del retículo endoplasmático (RE) dentro de la célula (Sousa et al., 1996). Teniendo en cuenta que el RE es el principal almacén del calcio movilizable, esto implica la importancia de la distribución intracelular de este orgánulo en la dirección de propagación de la onda de calcio. Por todo lo expuesto anteriormente, han sido numerosos los estudios realizados acerca de la estructura y organización del RE durante la maduración ovocitaria y tras la fecundación (Terasaki, 2004; Stricker, en prensa). Sin embargo, son escasos los estudios realizados mediante técnicas inmunocitoquímicas ultraestructurales en diferentes especies dada la complejidad de la técnica. Este hecho se hace más patente en la especie humana dada la gran dificultad para obtener suficientes muestras.

#### Análisis citoquímico mediante microscópica confocal

El uso de técnicas de inmunofluorescencia en combinación con la microscopía confocal ha permitido identificar proteínas del RE en ovocitos de diferentes especies (Parys et al., 1994; Balakier et al., 2002; Hoodbhoy et al., 2006). En el ovocito humano se ha demostrado la presencia de diferentes proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , chaperonas (como calreticulina, calsecuestrina y calnexina) y receptores relacionados con canales de calcio (Balakier et al., 2002). Nuestros resultados usando anti-calnexina corroboran igualmente un estudio previo indicando la presencia de calnexina en el ovocito humano tanto en VG como en MII (Balakier et al., 2002). Sin embargo, observamos diferencias en el patrón de distribución de calnexina comparado con el estudio de Balakier et al. (2002). Así, estos autores describen la presencia de tres zonas reactivas en los ovocitos en VG mientras que en MII sólo aparece una región cortical. En nuestro estudio se aprecia un marcaje en todo el citoplasma aunque es cierto que en algún ovocito se aprecia una mayor inmunofluorescencia en la región cortical coincidiendo con los datos obtenidos por Balakier y colaboradores. Estas diferencias podrían ser debidas a los diferentes protocolos de fijación, de permeabilización celular y de anticuerpos usados en ambos estudios. En nuestro estudio demostramos que la proteína PDI puede ser usada como un buen marcador del RE en ovocitos humanos como hemos descrito previamente para el ovocito de ratón (Jiménez-Movilla et al., 2005; Hoodbhoy et al., 2006). Este marcador se distribuye uniformemente por todo el ooplasma en los ovocitos humanos analizados. Este patrón es similar al que hemos obtenido para anti-calnexina. Un patrón similar ha sido observado igualmente usando como marcadores calsecuestrina y recep-

tores ryanodina (RyRs) en ovocitos, cigotos y embriones humanos (Balakier et al., 2002). Así, Balakier et al. (2002) observan compartimentos del RE enriquecidos en calreticulina y el receptor del InsP3 (InsP3R-2) y otro compartimento enriquecido en calsequestrina y RyRs. En ovocitos de otras especies se ha descrito un patrón de distribución diferente al observado en ovocito humano para calreticulina (Parys et al., 1994). PDI y calnexina muestran un patrón similar en todo el ooplasma tanto en ovocitos en VG como en MII. Este resultado difiere de otro estudio realizado previamente usando calnexina y otros marcadores (Balakier et al., 2002). Estudios posteriores utilizando un mayor número de marcadores del RE son necesarios realizar a nivel de microscopía confocal y a nivel ultraestructural para conocer con precisión si existen diferentes compartimentos del RE donde predomine la presencia de algún(os) marcador(es). Estos diferentes compartimentos del RE y su posible modificación durante el proceso de maduración ovocitaria podrían ser responsables de importantes acontecimientos que se producen durante la maduración ovocitaria, fecundación y desarrollo embrionario temprano.

#### Análisis citoquímico mediante microscopía electrónica

Son escasos los estudios realizados acerca de la estructura y distribución del RE de ovocitos y embriones humanos debido a la dificultad para conseguir estas muestras. En 1994, el grupo dirigido por el Dr. Sathananthan observó la existencia de un típico RER compuesto de cisternas alargadas únicamente en los folículos antrales de pequeño tamaño (Sathananthan, 1994); sin embargo, este RER está ausente en ovocitos maduros y reaparece en embriones en el estado de ocho células (Sathananthan, 1997). Estos resultados son sorprendentes puesto que es sabido que este RER juega un papel clave en la fisiología celular además son aparentemente contradictorios al compararlos con estudios que utilizan técnicas citoquímicas usando marcadores típicos del RER de células secretoras como calnexina (Balakier et al., 2002). Así, calnexina es una chaperona que asegura el correcto plegamiento de las glicoproteínas recientemente sintetizadas en el RER (Williams, 2006). En este estudio hemos realizado un análisis citoquímico ultraestructural para identificar y localizar las estructuras que presentan PDI y calnexina. Hemos usado estos dos marcadores puesto que son proteínas típicas del RE y en concreto del RER (Eilgaard and Ruddock, 2005; Williams, 2006). Este análisis ultraestructural se ha podido realizar únicamente con el PDI puesto que el anticuerpo anti-calnexina no mostró inmunoreactividad en las secciones ultrafinas de ovocitos. Es conocida la dificultad para la localización *in situ* mediante microscopía electrónica de determinadas proteínas o antígenos debido a que estos son sensibles al procesamiento y fijación con glutaraldehído seguidos para realizar los estudios citoquímicos. En cambio, este procesamiento no ha afectado a la localización de PDI en secciones ultrafinas de ovocitos de ratón (Hoodbhoy et al., 2006) ni a los ovocitos humanos como demuestra este estudio. El uso del anticuerpo anti-PDI nos revela la existencia de unas vesículas con un diámetro medio superior a 100 nm con un alto marcaje que se encuentran distribuidas por todo el ooplasma coincidiendo con los datos obtenidos mediante microscopía confocal. Sin embargo, no podemos demostrar de un modo inequívoco la presencia de ribosomas en estas vesículas. El marcaje específico en estas vesículas así como en las típicas cisternas de RER de las células de cúmulo observadas

en las mismas secciones ultrafinas nos sugiere que estas vesículas se corresponden con un tipo especial de RER presente en el ovocito humano. Este último resultado nos hace descartar la posibilidad que estas vesículas presentes en el ovocito sean un artefacto debido a la preparación de la muestra. Además, cabe destacar que vesículas de características morfológicas y específicamente marcadas con el anticuerpo anti-PDI han sido previamente identificadas en los ovocitos de ratón procedentes de folículos desarrollados (Jiménez-Movilla et al., 2005; Hoodbhoy et al., 2006). Esto implica que existe un proceso de transformación de cisternas de RER a vesículas durante la maduración ovocitaria y que parece ser un proceso conservado al estar descrito tanto en la especie murina como en la especie humana. Son necesarios estudios futuros para conocer las implicaciones funcionales de este cambio. A partir de datos obtenidos en otros estudios realizados en el ratón podemos suponer que estas vesículas son funcionales y que participarían en la síntesis de proteínas puesto que las glicoproteínas de la zona pelúcida se sintetizan hasta momentos antes de la ovulación (Wassarman, 1988).

Vesículas similares morfológicamente a las descritas en este estudio han sido previamente descritas y han sido consideradas como un tipo de RE liso (Sousa et al., 1997). Así, el RE liso aparece morfológicamente formando diferentes estructuras como vesículas pequeñas, grandes vesículas rodeadas por mitocondrias y agregados de pequeñas estructuras tubulares rodeadas por mitocondrias (Sathananthan, 1997, 2003; El Shafie et al., 2000). En nuestro estudio los agregados de pequeñas estructuras tubulares rodeadas por mitocondrias no fueron marcados por el anticuerpo anti-PDI. Las pequeñas vesículas próximas al oolema que contienen calcio han sido descritas en los ovocitos humanos sin fecundar (Sousa et al., 1997). La naturaleza de estas vesículas es aún desconocida y los autores sugieren que podrían corresponderse con calciosomas descritos previamente en células no musculares (Volpe et al., 1988) o que sean un tipo especial de RE liso (Sousa et al., 1997). No descartamos la posibilidad planteada por los autores de que algunas de estas vesículas por su localización y su tamaño se correspondan con las vesículas descritas en nuestro estudio.

En resumen, en nuestro estudio demostramos la presencia de RE gracias al uso de técnicas inmunocitoquímicas en combinación con el microscopio confocal y el microscopio electrónico de transmisión. Este RE se encuentra distribuido de un modo homogéneo por todo el ooplasma tanto en ovocitos en VG como en MII. El análisis citoquímico ultraestructural nos demuestra la presencia de unas vesículas de un diámetro aproximado de 100 nm que son inmunomarcadas con el anticuerpo anti-PDI al igual que las cisternas de RER de las células del cúmulo. Estos resultados nos sugieren la existencia de un RER con morfología atípica en el ovocito humano que no ha sido descrito previamente. Esta puede ser la razón por la cual no se haya identificado mediante el uso de la microscopía electrónica convencional y de la aparente contradicción vistos los datos de microscopía confocal. El desarrollo y utilización de técnicas mucho más sensibles nos permitirá identificar los distintos componentes del ovocito y su relación entre ellos. Esta información nos aportará datos más precisos sobre el papel jugado por cada uno de estos componentes intracelulares y un mejor conocimiento de la fisiología de esta

célula aparentemente simple que es el ovocito.

### Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado con proyectos del MEC (BFU2004-05568BFI) y de la Fundación Salud 2000. Queremos agradecer a M<sup>a</sup> Carmen Marín Serrano por el excelente trabajo técnico, a los miembros de la Unidad de Reproducción del Hospital La Fe de Valencia por su colaboración, al Servicio de Microscopía y a la Unidad de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia.

### Bibliografía

- Balakier H, Dziak D, Sojecki A, Librach C, Michalak M, Opas M. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2002; 17:2948-9.
- Baumann O, Walz B. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 2001; 205:149-214.
- Coopers. *La Célula*. 2<sup>o</sup> Ed. Editorial Marban; 2007.
- El-Shafie M, Windt ML, Ktshoff M, McGregor P, Sousa P, Sousa M, Wranz PAB, Kruger T. Ultrastructure of human Oocytes: a transmission electron microscopic view. En "An atlas of the ultrastructure of human Oocytes. A guide for assisted reproduction". El-Shafie M, Sousa M, ML Windt y TF Kruger editors. The Parthenon Publishing Group, Londres. 2000; p. 83-173.
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 1999; 286:1882-8.
- Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 2005; 6:28-32.
- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8:485-9.
- FitzHarris G, Marangos P, Carroll J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol* 2007; 305:133-44.
- Hoodbhoy T, Avilés M, Boris Baibakov, Olga Epifano, María Jiménez-Movilla, Lyn Gauthier, and Jurrien Dean. ZP2 and ZP3 Traffick Independently within Oocytes prior to Assembly into the Extracellular Zona Pellucida. *Mol Cell Biol* 2006; 26:7991-8.
- Jiménez-Movilla M, Avilés M, Castells MT, Ballesta J. Ultrastructural analysis of the endoplasmic reticulum in the mice oocytes during the folliculogenesis. *Histol Histopathol* 2005.
- Jiménez Movilla M. Análisis de la composición, estructura y función de las glicoproteínas de la zona pelúcida con especial referencia a la especie humana. 2005; Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Kline D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr Top Dev Bio* 2000; 50:125-54.
- Levine T, Rabouille C. Endoplasmic reticulum: one continuous network compartmentalized by extrinsic cues. *Cell Biol*. 2005; 17:362-8.

- Newman, GR. LR White embedding medium for colloidal gold methods 1989;p. 47-75. En M.A. Hayat ed. Colloidal gold: principles, methods and applications, vol. 2. Academic Press, San Diego, Calif. Estados Unidos.
- Papp S, Dziak E, Michalak M, Opas M. Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  handling proteins. J Cell Biol 2003; 160:475-9.
- Parekh A, Putney J. Store-Operated Calcium Channels. Physiol Rev 2005; 85:757-810.
- Parys JB, McPherson SM, Mathews L, Campbell KP, Longo FJ. Presence of inositol 1,4,5-triphosphate receptor, calreticulin, and calsequestrin in eggs of sea urchins and *Xenopus laevis*. Dev Biol 1994; 161:466-76.
- Sathananthan A. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian Oocytes: unique aspects of the human oocyte. Microscopy research and technique 1994; 27:145-64.
- Sathananthan A. Ultrastructure of the human egg. Hum Cell 1997; 10:21-38.
- Sathananthan AH. Morphology and pathology of the human oocyte. En "Biology and Pathology of the oocyte. Role in fertility and Reproductive medicine". Editores Alan O- Trounson y Roger G. Gosden. Cambridge University Press. Reino Unido.2003; p.185-208.
- Sousa M, Barros A, Tesarik J. Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmic reticulum organization in human preimplantation embryos. Mol Hum Reprod 1996; 2:967-77.
- Sousa M, Barros A, Silva J, Tesarik J. Developmental changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. Mol Hum Reprod 1997; 3:83-90.
- Stricker SS (En prensa). Structural reorganizations of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. Semin. Cell Dev. Biol.
- Terasaki M. Dynamics of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus during early sea urchin development. Mol Biol Cell 2004; 11:897-914.
- Terasaki M, Jaffe LA. Labelling of cell membranes and compartments for live cell fluorescent microscopy. Methods Cell Biol 2004; 74:469-89.
- Voeltz GK, Rolls MM, Rapoport TA. Structural organization of the endoplasmic reticulum. EMBO reports 2002; 3:944-50.
- Volpe P, Krause KH, Hasimoto S, Zorzato F, Pozzan T, Meldolesi J, Lew DP. "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  store of nonmuscle cells? Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:1091-5.
- Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. Annu Rev Biochem 1988; 57:415-42.
- Williams DB. Beyond lectins: the calnexin/calreticulum chaperon system of the endoplasmic reticulum. J Cell Sci 2006; 119:615-23.

*“Nuestro más sincero agradecimiento a las entidades colaboradoras”*

**COLABORACIONES CONGRESO ASEBIR 2007  
PRINCIPALES COLABORADORES**

**PLATINO**



Equipos Medico-Biológicos S.A.  
[www.embiol.com](http://www.embiol.com)

**PLATA**



MediCult España S.L.  
[www.medicult.com](http://www.medicult.com)



Serono España, S.A. An Affiliate of Merck Serono, S.A.  
[www.fertilityspain.com](http://www.fertilityspain.com)

**OTROS PATROCINADORES**



Controltecnica Instrumentación científica S.L.  
[www.controltecnica.com](http://www.controltecnica.com)



Organon Española, S.A.  
[www.organon.es](http://www.organon.es)



Vitrolife  
[www.vitrolife.com](http://www.vitrolife.com)

# A G R A D E C I M I E N T O S

Patrocinadores

176



Áliad Calidad, S.L.  
[www.aliad.es](http://www.aliad.es)



Centro Medicina Embrionaria  
[www.centromedicinaembrionaria.com](http://www.centromedicinaembrionaria.com)



Sistemas Genómicos  
[www.sistemasgenomicos.com](http://www.sistemasgenomicos.com)



Biocare Europe  
[www.biocareeurope.com](http://www.biocareeurope.com)



Cook Medical  
[www.cookmedical.com](http://www.cookmedical.com)



Durviz  
[www.durviz.com](http://www.durviz.com)



Ferring, S.A.  
[www.ferring.com](http://www.ferring.com)



Izasa, S.A.  
[www.izasa.es](http://www.izasa.es)



Leica Microsistemas S.A.  
[www.leica-microsistemas.com](http://www.leica-microsistemas.com)



Olympus  
[www.olympus-europa.com](http://www.olympus-europa.com)

# A G R A D E C I M I E N T O S



Reprogenetics Spain, S.A.  
[www.reprogeneticsspain.com](http://www.reprogeneticsspain.com)



Sartorius  
[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)



Noray Bioinformatics, S.L.  
[www.noraybio.com](http://www.noraybio.com)



BioSperm  
[www.biosperm.es](http://www.biosperm.es)



Instituto Cefer  
[www.institutocefer.com](http://www.institutocefer.com)



Microptic S.L.  
[www.micropticsl.com](http://www.micropticsl.com)



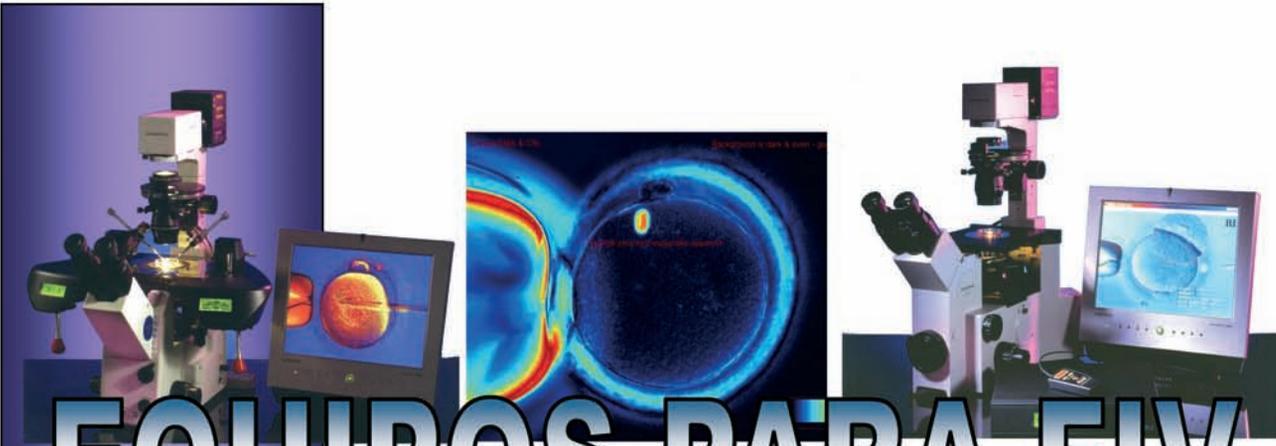
Laboratorios Seid  
[www.lab-seid.com](http://www.lab-seid.com)



Telstar  
[www.telstar.eu](http://www.telstar.eu)



Quermed, S.A.  
[www.quermed.com](http://www.quermed.com)



# EQUIPOS PARA FIV

Micromanipuladores, Laser, Oosight (Visu. Huso Meiotico)...



# CONTROL DE CALIDAD

Medidores de PH, Volatiles, Particulas, Termometros...



Quermed,s.a.

T 902102163 / F 915040440  
quermed@quermed.com  
www.quermed.com



# MEDIOS DE CULTIVO

HTF, Vitrificación, Aceite...





# **CD INTERACTIVO COMUNICACIONES ORALES COMUNICACIONES PÓSTER**



# IV CONGRESO ASEBIR

21 AL 23 DE NOVIEMBRE DE 2007  
BILBAO. PALACIO EUSKALDUNA



ASEBIR

IV CONGRESO

BILBAO 2007

**ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO  
DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**