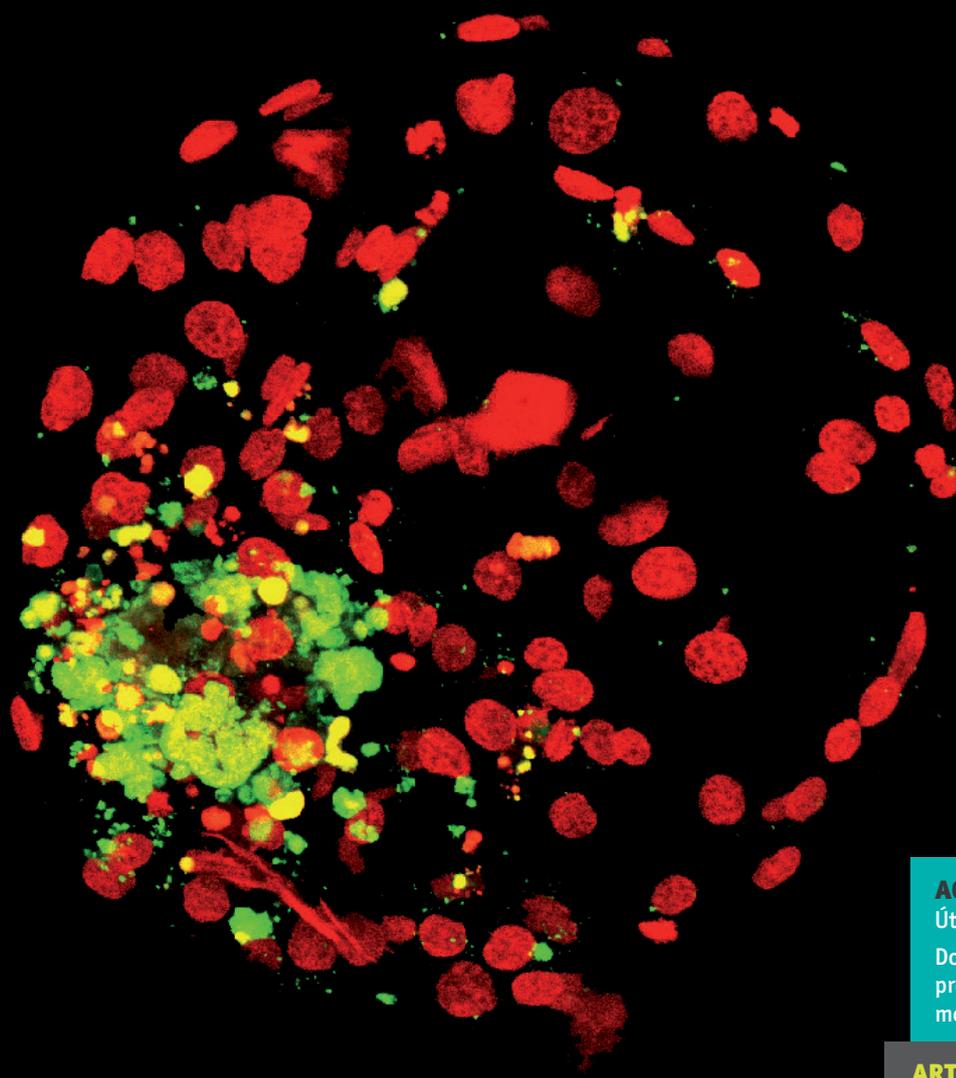


REVISTA

# ASEBIR



#### ACTUALIDAD

Útero de alquiler.

Documento sobre diagnóstico genético preimplantacional y enfermedades monogénicas.

#### ARTÍCULOS

Animales transgénicos y *knockouts*.  
Vitrificación de blastocistos bovinos producidos in vitro en diferentes estadios de desarrollo.

#### AULA JOVEN

Impacto de la oligozoospermia en el patrón de vacuolización espermática en muestras en fresco.

#### FORMACIÓN CONTINUADA

¿Cómo y por qué se produce la señalización por ondas de  $Ca^{2+}$  durante la fecundación?.

# Vit Kit® - Freeze and Vit Kit® - Thaw



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



Werfen Group



Para más información : [irvine@izasa.es](mailto:irvine@izasa.es) o visite nuestra web [www.izasa.es](http://www.izasa.es)

Only from Irvine Scientific



IrvineScientific  
Grow With Us™

# ASEBIR

## SUMARIO

SUMARIO	Pág.
<b>EDITORIAL</b>	<b>3</b>
Bob Edwards y la FIV: un premio a la lucha contra la esterilidad Anna Veiga	
<b>ACTUALIDAD</b>	<b>4</b>
Útero de alquiler Gad Lavy	
Documento sobre diagnóstico genético preimplantacional y enfermedades monogénicas elaborado por el grupo de interés en DGP para la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida Montse Boada, Mark Grossmann	
<b>ARTÍCULOS</b>	<b>16</b>
Animales transgénicos y <i>knockouts</i> : herramientas clave en el esclarecimiento de las bases moleculares de la infertilidad femenina Paloma Sánchez-Aparicio, Sierra Muñoz-García, Jorge Cuadros	
Vitrificación de blastocistos bovinos producidos in vitro en diferentes estadios de desarrollo. Roser Morató, Dolores Izquierdo, María Teresa Paramio, Teresa Mogas	
<b>AULA JOVEN</b>	<b>35</b>
Impacto de la oligozoospermia en el patrón de vacuolización espermática en muestras en fresco Laura Prats, María Rodríguez Agüera, Olga Cairó, Sergio Rovira, Felipe del Río, Arturo Brassesco, Mario Brassesco	
<b>DEBATE</b>	<b>40</b>
Vitrificación de ovocitos para retrasar la maternidad Preservación social, ¿una realidad o ficción? Preservación de la fertilidad por causas sociales, ¿por qué no? Vitrificación de oocitos para elegir el momento de gestar ¿Por qué nosotros no enviamos los datos al registro SEF?	
<b>FORMACIÓN CONTINUADA</b>	<b>45</b>
¿Cómo y por qué se produce la señalización por ondas de Ca <sup>2+</sup> durante la fecundación? Aida M. López-Guerrero, Vanessa Casas-Rua, Mario J. Perianes, Patricia Tomás-Martín, Eulalia Pozo-Guisado, Ignacio Santiago Álvarez-Miguel, Francisco Javier Martín-Romero	
<b>AGENDA</b>	<b>54</b>
<b>NOTICIAS</b>	<b>55</b>
<b>INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES - NORMAS DE PUBLICACIÓN</b>	<b>56</b>

Imagen de portada: Imagen de microscopía confocal de un blastocisto teñido con la tinción de TUNEL para visualizar el ADN fragmentado. Cortesía de Morató et al., pp.27.

### EDITA

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

### EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dr. Jorge Cuadros Fernández  
CLÍNICA FIVMADRID, Madrid

### COMITÉ EDITORIAL

#### Presidente:

Dr. Manuel Ardoy Vilches  
HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

#### Vicepresidenta y RRRP:

Dra. Carmen Ochoa Marieta  
CER. CLINICA COTERO - Santander

#### Secretaría y RRRP:

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DE XEUS - Barcelona

#### Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero  
INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

#### Vocalía de Grupos de Interés e Investigación:

Dr. Josep Santaló Pedro  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

#### Vocalía de congresos:

Dra. María José Torelló Ybañez  
HOSPITAL QUIRÓN BARCELONA - Barcelona

Dra. Yolanda Mínguez Royo  
IVI MADRID - Madrid

#### Vocalía de Docencia y formación continuada:

Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel  
INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA -IERA -Badajoz

Dr. Josu Franco Iriarte  
CENTRO SANITARIO VIRGEN DEL PILAR - San Sebastian

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

#### Vocalía Página Web:

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

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

### PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR  
C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º, 6ª  
28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94  
www.asebir.com · asebir@asebir.com

### DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

GÓBALO: Gráfica · Web · Multimedia · Consultoría  
C/ Castillo de Fuensaldaña 4, Oficina 213  
28232 · Las Rozas · Madrid  
Tfno - Fax.: 91 626 39 74  
www.gobalo.es · info@gobalo.es

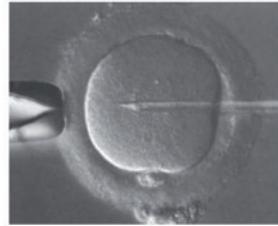
Depósito legal: M-18873-1996  
ISSN: 1136-4424  
Soporte válido: 78-R-CM

**CONTROLTECNICA**

**instruments**

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

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



**Instrumentación científica para ciencias de la vida**



**Controltecnica Instrumentación Científica S.L**

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

E-mail: [lab@controltecnica.com](mailto:lab@controltecnica.com)

## BOB EDWARDS Y LA FIV: UN PREMIO A LA LUCHA CONTRA LA ESTERILIDAD

El premio Nobel de Fisiología y Medicina de este año ha sido concedido al Dr. Robert G. Edwards, la persona que no sólo desarrolló la técnica de la Fecundación in Vitro (FIV) y permitió el nacimiento del primer bebé gracias a ella en Julio de 1978, sino que revolucionó el tratamiento de la esterilidad a través de los tratamientos de reproducción asistida.

Se trata de un premio muy esperado por los profesionales de este campo, que ha tardado en llegar. Hace ya 33 años que nació Louise Brown en Oldham, en el Reino Unido, gracias a la labor de este fisiólogo y del ginecólogo Patrick Steptoe. Bob Edwards desarrolló la técnica en modelos animales y fue capaz de demostrar que el embrión humano podía ser cultivado "in Vitro" y, tras su implantación, dar lugar al nacimiento de un niño sano. Se calcula que, hoy en día, más de cuatro millones de niños y niñas han nacido gracias a la FIV, incluyendo las técnicas complementarias que han ido surgiendo en torno a ella.

Bob Edwards y Patrick Steptoe no lo tuvieron fácil en sus inicios. No recibieron apoyo financiero por parte del UK MRC (Medical Research Council) debido a las serias dudas éticas y científicas que la técnica que proponían levantó entre sus colegas. Tras la publicación de una carta en la revista The Lancet en 1978, en la que se describía el nacimiento del primer ser humano engendrado en el laboratorio, otros laboratorios empezaron a trabajar para reproducir esos resultados. Le siguieron los grupos de EEUU y de Australia en obtener nacimientos y en España, Victoria Anna nació en el Institut Universitari Dexeus de Barcelona el año 1984. Hoy en día se trata de una técnica estandarizada que se practica de rutina en numerosos centros en todos los países desarrollados, tanto a nivel público como privado. Se trata de un tratamiento médico consolidado que la sociedad entiende, acepta y utiliza.

Existen determinados sectores que se manifiestan en contra de la FIV y como muestra valga la reacción del Vaticano frente a la concesión del Nobel a Bob Edwards. Los argumentos para la no aceptación de esta técnica se basan en preceptos religiosos que poco tienen que ver con la ciencia o la medicina.

Las legislaciones que se han desarrollado en distintos países en cuanto a la aplicación de la FIV son variables y en consecuencia las parejas viajan a otros países o continentes en busca de una solución a su problema que no pueden alcanzar en su país de origen. Existen estándares de calidad a nivel europeo regulados por directivas comunes, pero es imprescindible determinar unos mínimos estándares de calidad globales que garanticen la correcta práctica de estos tratamientos.

Hay que recordar también que la FIV ha sido la técnica que ha abierto las puertas a la investigación con células madre embrionarias y en consecuencia a los avances que se están produciendo en este campo. El conocimiento derivado del cultivo del embrión en el laboratorio permitió la obtención de células madre embrionarias en 1998, 20 años tras el nacimiento de Louise Brown.

El reconocimiento otorgado a Bob Edwards ha sido percibido por los profesionales que trabajamos en este ámbito como un reconocimiento global a este campo de la biomedicina, como un sello de prestigio a esta nueva especialidad medico-biológica que no siempre ha sido situada en su justo lugar. Los que hemos tenido la suerte de seguir sus pasos estamos felices de que finalmente le haya sido concedido, por él, por los nacimientos que ha permitido y permitirá, y también por nuestra profesión.

Anna Veiga  
Doctora en Biología  
Institut Universitari Dexeus/Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

## ÚTERO DE ALQUILER

Gad Lavy, M.D., FACOG.  
New England Fertility Institute. Stamford, CT

La subrogación de útero ha llegado a representar en el campo de la medicina otra opción reproductiva importante en el que una mujer lleva un embarazo de otra persona.

Existen dos tipos de subrogación: la tradicional y la gestacional. En la subrogación tradicional la madre de alquiler ha sido inseminada con el semen del futuro padre, y por lo tanto el niño fruto del embarazo tendrá la composición genética de ambos. En la subrogación gestacional, sin embargo, se ha creado un embrión proveniente de los óvulos de la futura madre o de una donante, por lo tanto la madre de alquiler no es la madre biológica del niño.

La mayoría de las indicaciones para este tipo de tratamiento son producidas por una disfunción uterina. Estas disfunciones pueden ser causadas por factores congénitos o cirugía, o como consecuencia de adherencias uterinas (síndrome de Asherman). Existen sin embargo condiciones médicas que prohíben el embarazo (diabetes severa, enfermedad renal, etc.). En estos casos la necesidad del vientre de alquiler dependerá de la naturaleza del problema médico y de su gravedad.

Actualmente existe una mayor demanda proveniente de parejas gays masculinas, así como de varones solteros que desean un hijo. Igualmente este tratamiento es demandado por mujeres que prefieren no llevar adelante un embarazo. Esta categoría de madres de alquiler es la más controvertida, ya que aquí es donde se presentan los problemas éticos. La decisión de realizar este tipo de subrogación a menudo se deja a la discreción de la clínica.

En todos los casos, las posibilidades de éxito de este tratamiento están estrechamente vinculadas al éxito de la FIV, teniendo en cuenta la edad de la pareja femenina (o donante de óvulos), su función ovárica, la calidad de los espermatozoides y el número de embriones transferidos. El mismo criterio se debe utilizar para aconsejar a las parejas interesadas en el alquiler de vientres con respecto a sus

posibilidades de éxito. En los casos de subrogación tradicional las posibilidades de éxito están vinculadas a la calidad de los espermatozoides, así como a la historia de la madre de alquiler (edad, estado de la ovulación, la función ovárica, etc.)

En los EE.UU., así como en otros países donde se practica la subrogación, la subrogación gestacional es actualmente la forma más común de las madres de alquiler.

A pesar de que el vientre de alquiler tradicional es simple y barato, las preocupaciones jurídicas, así como psicológicas, hacen que este tipo de tratamiento sea rechazado en la mayoría de los centros donde está permitido. La principal preocupación con la subrogación tradicional se produce cuando la madre sustituta se muestra reacia a entregar el niño después del nacimiento. El sonado caso de "Baby M" en la década de 1970 todavía resuena en muchas parejas. En este caso, la mujer subrogada, Mary-Beth Whitehead se negó a entregar el niño que concibió. Lo más importante a tener en cuenta en este tipo de procesos es la preocupación por el impacto emocional.

### SUBROGACIÓN: EL PROCESO

Basándonos en el proceso de subrogación gestacional, la Fecundación in Vitro se utiliza para crear embriones que se transfieren al útero de la madre de alquiler. Los óvulos pueden proceder de la futura madre o de una donante de óvulos. En estos casos, los ciclos de la madre de alquiler y la madre por objeto o donante de óvulos se sincronizan. Los embriones resultantes se transfieren al útero de la madre de alquiler. Tras la transferencia de los embriones se continúa con suplementación hormonal durante dos semanas hasta la prueba de embarazo.

La selección de las mujeres que alquilan su vientre se realiza generalmente a través de agencias que se especializan en la contratación de la mujer. Las mujeres subrogadas son generalmente menores de 42 años, no fumadoras y con la exigencia de que hayan tenido al menos un embarazo a término. Una vez seleccionada, se realiza

una visita al hogar por un trabajador social, para asegurar que sus condiciones de vida son aceptables y que ella está cuidando aceptablemente a sus propios hijos.

### EVALUACIÓN

Las madres de alquiler deben someterse a exámenes exhaustivos para asegurar que son médicamente y psicológicamente saludables.

El examen médico incluye una revisión exhaustiva de las historias clínicas y en particular los registros de embarazo. Cualquier complicación del embarazo se estudia y se evalúa. El examen médico incluye pruebas de enfermedades infecciosas y la evaluación del útero se realiza mediante una histeroscopia.

En todo este proceso es importante la evaluación psicológica incluyendo una entrevista con un psicólogo, así como una evaluación de la personalidad por escrito (MMPI: *Minnesota Multiphasic Personality Inventory*; PAI: *Personality Assessment Inventory*). En este punto es importante la naturaleza de la relación entre los futuros padres y la madre de alquiler, con lo que un estudio exhaustivo de las personalidades es necesario en todos los involucrados. Encontrar la combinación perfecta impedirá en un futuro problemas entre los padres y la madre de alquiler. Es por esto mismo que se realizará una reunión entre los futuros padres, la madre de alquiler y el psicólogo.

Aspectos éticos: Las mujeres de alquiler que principalmente se someten a este tipo de tratamiento son generalmente de una clase socioeconómica más baja que la de los futuros padres. Este hecho, así como el alto coste del alquiler de vientres ha hecho que este procedimiento esté reservado para posiciones socioeconómicas altas. Este problema es particularmente evidente cuando los futuros padres provienen de otros países. En países como la India, las madres de alquiler reciben una cantidad relativamente pequeña de dinero, con lo cual se entremezclan otros factores como puede ser la explotación.

## ASUNTOS LEGALES

El vientre de alquiler es ilegal en la mayoría de países europeos (España, Francia, Italia, Suiza) y restringido en otros (Reino Unido). Concretamente en EE.UU. la subrogación gestacional es legal en algunos estados e ilegal en otros. Algunos estados no prohíben la subrogación, pero no abordan la situación jurídica de la futura madre, así como la situación legal del niño recién nacido.

En EE.UU., el gobierno federal a través de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) controla el proceso de subrogación en los padres, controlando cualquier tipo de enfermedad infecciosa, protegiendo de esta forma a la madre de alquiler. Además, la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM) recomienda una evaluación psicológica de los futuros padres y de la madre de alquiler.

Un contrato legal es requerido entre la madre subrogada y los futuros padres, abarcando todos

los aspectos del proceso, incluyendo el número de embriones a transferir y las disposiciones para la reducción selectiva en caso de embarazo múltiple o un aborto en el caso de anomalías.

## CONSIDERACIONES ESPECIALES

Se ha extendido desde hace unos años la subrogación internacional, provocando que el turismo médico sea una realidad: En el ámbito de la subrogación se ha hecho posible que las parejas viajen al extranjero para el alquiler de vientres.

Muchas parejas europeas prefieren viajar a los EE.UU. y someterse a este tipo de tratamientos, debido a las altas tasas de éxito de la FIV y al hecho de que el proceso de subrogación está legalmente muy regulado. En los EE.UU. en la mayoría de los casos las parejas extranjeras pueden registrar sus nombres en el acta de nacimiento del niño y, por lo tanto, "legítima" a los padres con lo cual no es necesario adoptar al niño después del nacimiento. Esto facilita el proceso de

viajar con el recién nacido al país de origen, pudiendo inscribirlo en el país natal de los padres sin ningún tipo de problema.

Este tipo de tratamientos está floreciendo en la India, donde el nivel de la atención médica es alto, la subrogación es legal y el coste es bajo.

El principal problema proveniente de este país es el vacío legal existente a la hora de registrar al futuro bebé.

La demanda más creciente de estos tratamientos se está produciendo en el mundo homosexual y en hombres solteros donde la alternativa de familias cada vez es más común y aceptable.

El coste del proceso en los EE.UU. es alto, variable en función de la naturaleza exacta del procedimiento, viéndose incrementado cuando se requiere la donación de óvulos. El alto coste, es pues, limitante para muchas parejas que quieren ser usuarias del alquiler de vientres y lograr su sueño de tener hijos.

**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 espermatozoides, cultivo de embriones, criopreservación y Maduración In Vitro de ovocitos.

**MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.**



**MediCult España S.L.**

Gran Vía 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

## DOCUMENTO SOBRE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL Y ENFERMEDADES MONOGENÉTICAS ELABORADO POR EL GRUPO DE INTERÉS EN DGP PARA LA COMISIÓN NACIONAL DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

Montse Boada i Palà

Servei de Medicina de la Reproducció. Institut Universitari Dexeus

Mark Grossmann i Camps

Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon

Como es bien sabido, la Ley 14/2006 sobre técnicas de Reproducción Humana Asistida en su artículo 12º, establece ciertas consideraciones en la aplicación de las técnicas de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP). Si bien amplía algunos de los supuestos de aplicación (DGP-HLA), también incrementa el control de la administración sobre la práctica de dichas técnicas.

Con el fin de evitar trámites innecesarios, se permite la práctica del DGP sin necesidad de solicitar autorización caso a caso cuando se trata de enfermedades hereditarias graves de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento posnatal (artículo 12.1.a) o para la detección de otras alteraciones que puedan comprometer la viabilidad del preembrión (artículo 12.1.b) sin entrar en más detalles.

Además, en el preámbulo de la ley se pone de manifiesto la intención del legislador de evitar el estancamiento que se derivaría de publicar listas cerradas de enfermedades y patologías autorizadas

*La nueva Ley sigue un criterio mucho más abierto al enumerar las técnicas que, según el estado de la ciencia y la práctica clínica, pueden realizarse hoy día. Sin embargo, evita la petrificación normativa, y habilita a la autoridad sanitaria correspondiente para autorizar, previo informe de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida, la práctica provisional y tutelada como técnica experimental de una nueva técnica; una vez constatada su evidencia científica y clínica, el Gobierno, mediante real decreto, puede actualizar la lista de técnicas autorizadas.*

Dicha previsión es lógica pues tal y como ya se preveía, a lo largo de los últimos años el número de alteraciones detectables mediante DGP ha crecido exponencialmente (Vidal, 2007, *ESHRE PGD Consortium*) debido al impulso experimentado tanto por los protocolos de diagnóstico genético como por las técnicas de Reproducción Humana Asistida. Por lo tanto, limitar algo tan dinámico como el DGP sería muy poco práctico.

La Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA), que es el órgano asesor encargado de autorizar los ciclos de DGP caso a caso cuando no corresponden a los supuestos 12.1.a y 12.1.b, desconoce la realidad de la práctica del DGP en nuestro país. No dispone de información exacta sobre cuántos casos de DGP se realizan anualmente en España ni qué tipo de alteraciones se diagnostican, sencillamente porque no existe un sistema protocolizado de recogida de datos. Dicha falta de información obviamente dificulta la función de la CNRHA a la hora de asesorar a la Administración Sanitaria.

ASEBIR siempre se ha mostrado muy preocupada por esta acuciente falta de información y ha prestado todos sus datos (provenientes de las encuestas del grupo de interés en DGP) con la clara intención de rellenar los vacíos existentes, colaborar en nuevas estrategias de seguimiento y agilizar la tramitación de los casos de DGP que se solicitasen.

En esta línea, durante el año 2009 se solicitó de ASEBIR su colaboración para elaborar un formulario normalizado para la recogida anual de datos de DGP, así como una lista consensuada de las principales

enfermedades monogénicas susceptibles de diagnóstico mediante DGP.

Aunque nuestros expertos en DGP siempre han considerado que limitar el DGP más de lo que se limita el diagnóstico prenatal carece de sentido, ASEBIR aceptó el reto y mantuvo un largo e intenso debate vía e-mail, tras lo cual se organizó una reunión presencial para ratificar el documento final. Los expertos que participaron en la reunión de consenso celebrada el 4 de Mayo de 2009 fueron: Esther Fernández, Silvia Fernández, Carles Giménez, Julio Martín, Mónica Parriego, Esther Velilla y Xavier Vendrell, todos ellos miembros del Grupo de Interés en DGP de ASEBIR, y Montse Boada y Mark Grossmann en representación de la Junta Directiva.

El trabajo de consenso realizado se remitió a la CNRHA en Mayo de 2009. Si bien el formulario de recogida anual de datos de DGP se aceptó sin modificaciones, se remitió a las distintas administraciones autonómicas y en la mayoría de los casos ya se está utilizando, la lista de enfermedades monogénicas susceptibles de DGP duerme el sueño de los justos ya que incomprensiblemente no se ha debatido aún en el plenario de la Comisión.

Consideramos que la aceptación de dicha lista sería de gran utilidad tanto para la administración central como para las autonómicas, a la hora de decidir qué casos deben remitirse a la CNRHA y cuáles no. Disponer de un documento consensuado, evidentemente revisable cuando el estado de la ciencia así lo requiriera, (al igual que ya hizo la HFEA en su día) agilizaría los trámites de

algunas enfermedades disminuyendo la agonía que sufren los pacientes ante el excesivo tiempo de espera que actualmente soportan antes de conseguir la evaluación de su caso.

Por todo ello y con el fin de contribuir favorablemente a la buena praxis y al correcto cumplimiento de la normativa actual sobre DGP, publicamos íntegramente el documento que en su día ASEBIR remitió a la CNRHA, y agradecemos a los participantes del Grupo de Interés su esfuerzo y buen hacer, que esperamos no quede en saco roto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Ley 14/2006 de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE 126, 27/05/2006, pp 19947-19956.

Vidal, F. (2007) Comentario científico al artículo 12. En Comentarios Científico-Jurídicos a la Ley sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. Lledó F., Ochoa, C. Y Monje O. (eds). Editorial Dykinson, Madrid.

ESHRE PGD Consortium. <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Specialty-Groups/SIG/Reproductive-Genetics/PGD-Consortium/page.aspx?201>.

HFEA. <http://www.hfea.gov.uk/pgd-screening.html>.

## NOTA DE ACTUALIDAD

*La idea de un listado revisable de enfermedades monogénicas que no precisen pasar por los requerimientos del artículo 12.2 de la Ley 14/2006 es, desde luego, una necesidad que cada vez toma más fuerza. Tal y como se comenta en el texto previo, el interés en ello no es nuevo y desde el año 2009 existe la propuesta de ASEBIR, elaborada a petición de la CNRHA, a la que hoy damos difusión publicándola en nuestra revista.*

*Con la idea del equilibrio lógico entre la necesidad de responder a los pacientes con la menor demora posible y la cautela que precisa la materia que nos ocupa, en la última sesión de la CNRHA (noviembre 2010) se acordó que, sobre la base del trabajo hecho por el Grupo de Interés en DGP de ASEBIR, las diferentes sociedades científicas presentes en la CNRHA deberán redactar una propuesta consensuada que finalmente podría ser aceptada oficialmente por dicha comisión. Teniendo en cuenta que los plazos dependen de las decisiones que se tomen, siempre con la meta de mejorar la calidad y la seguridad de la asistencia prestada, desde la junta de ASEBIR consideramos que disponer de dicho listado en los primeros meses del año 2011 sería un buen resultado.*

Manuel Ardoy  
Presidente de ASEBIR

## DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP) Y ENFERMEDADES MONOGÉNICAS.

### 1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una forma muy precoz de diagnóstico que apoyándose en las nuevas técnicas de reproducción asistida hace posible el estudio genético en los embriones antes de ser transferidos al útero y por tanto antes de la implantación.

Los primeros intentos de diagnóstico genético preimplantacional en embriones humanos tuvieron que esperar al desarrollo de la técnica de PCR a principios de los años 80. Los primeros embarazos fueron publicados en 1990 y se trataba de parejas con enfermedades de herencia ligada a los cromosomas sexuales, en las cuales la identificación del sexo embrionario se realizó mediante la amplificación de una secuencia de DNA específica del cromosoma Y. En la actualidad la técnica de PCR se aplica en el DGP para enfermedades monogénicas.

Desde que en 1990 se publicaron los primeros casos de niños nacidos tras DGP, la *European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), a través de su consorcio de DGP, ha recopilado anualmente los resultados y la evolución de 12.397 ciclos que han dado lugar a 2.027 recién nacidos hasta Octubre de 2005. La primera recopilación de datos de este grupo incluyó un total de 392 ciclos de DGP realizados hasta septiembre de 1998 y la última publicación recoge un total 3.358 ciclos de DGP realizados tan sólo durante el año 2004 en 45 centros adscritos, lo que muestra el aumento en el número de parejas que se someten a un tratamiento de este tipo.

En el ámbito Nacional, el departamento de Biología Celular de la Universidad Autónoma de Barcelona fue pionero en este campo, en concreto en los estudios citogenéticos mediante FISH. La primera publicación de un embarazo conseguido en España mediante DGP fue realizada de forma conjunta por este grupo y el Instituto Dexeus en 1994, en una pareja en la que la mujer era portadora de hemofilia y en la actualidad la aplicación de esta técnica se va extendiendo a otros centros en diversas comunidades autónomas.

Por último, la incorporación de la técnica de PCR al estudio de mutaciones concretas de enfermedades monogénicas, dio la posibilidad



Asistentes a la reunión de consenso. De pie: Mark Grossman, Esther Fernández, Carles Giménez y Xavier Vendrell. Sentados: Silvia Fernández, Julio Martín, Mónica Parriego y Montse Boada

de detectar más patologías, como la Fibrosis Quística realizado por primera vez en España por este grupo en colaboración con el IVI en 2000; la enfermedad de Huntington en 2001 por el equipo de reproducción de la Fundación Jiménez Díaz... y así se incorporaron equipos como Reprogenetics en el 2003, Centro de Medicina Embrionaria en el 2004, Sistemas Genómicos en 2005... y con el desarrollo de la técnica de DGP para nuevas enfermedades hereditarias es hoy posible aplicar DGP para cualquier enfermedad monogénica de la que se sepa el gen causante.

## 2- ENFERMEADES MONOGENICAS

En la base de datos de referencia para los especialistas en diagnóstico genético *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM™) hay descritas más de 15.000 enfermedades y van aumentando año a año.

El número de enfermedades monogénicas es mayor de seis mil. Cada una de ellas suele ser poco frecuente pero, en su conjunto, constituyen un problema médico de primera magnitud debido a que muchas de ellas causan graves trastornos a los pacientes y representan una gran carga física y emocional, cuando no socioeconómica, para las familias.

En España, hasta el momento, se ha realizado DGP para 91 enfermedades monogénicas distintas (ver anexo 1) y esta cifra también aumentará año a año.

Según la legislación española actual (Ley 14/2006, artículo 12), todas las enfermedades monogénicas graves, de aparición precoz y no susceptibles de tratamiento curativo postnatal están incluidas en el apartado 12.1.a, por lo que deberían poderse realizar sin necesidad de informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA).

Y así se contempla en las tablas de recopilación de datos de DGP que se han presentado a la CNRHA (ver anexo 2).

## 3- SOLICITUD DE LA CNRHA DE ELABORAR UNA LISTA DE PRINCIPALES ENFERMEADES MONOGENICAS

ASEBIR recibe la solicitud de la Dirección General de Terapias Avanzadas y Trasplantes de elaborar una lista con las principales enfermedades monogénicas susceptibles de diagnóstico mediante DGP.

ASEBIR deja constancia de que las principales sociedades científicas internacionales (ESHRE y PGDIS) elaboran listas con esa información y que, a nivel español, la lista elaborada por el giDGPI de ASEBIR que considera adecuada es la presentada a la CNRHA en la pasada reunión (Anexo 1).

ASEBIR, conjuntamente con su grupo de interés en DGP, considera que la elaboración de un listado de enfermedades que no precisen autorización expresa es de poca utilidad ya que se genera la exclusión de determinadas enfermedades que cumplen los mismos criterios que las que puedan aparecer en una lista cerrada. En este sentido ASEBIR propone, en el punto 4 del presente documento, unos criterios que deben cumplir las enfermedades para ser susceptibles de DGP sin necesidad de una autorización expresa.

No obstante, ante la reiteración de aportar una lista más reducida que no precise de autorización expresa por parte de la CNRHA, y a pesar de considerarlo poco adecuado, hemos elaborado una lista de mínimos, que deberá revisarse periódicamente para actualizarla según el estado de la cuestión, y en la que se incluyen las enfermedades monogénicas graves más comunes, clasificadas en tres grupos: generales, metabólicas y de cáncer hereditario.

Los expertos que participaron en la reunión de consenso celebrada el 4 de Mayo de 2009 fueron: Esther Fernández, Silvia Fernández, Carles Giménez, Julio Martín, Mónica Parriego, Esther Velilla y Xavier Vendrell, todos ellos miembros del grupo de interés en DGP, y Montse Boada y Mark Grossmann en representación de la Junta Directiva de ASEBIR.

## LISTADO DE LAS ENFERMEADES MONOGENICAS QUE NO DEBERIAN REQUERIR AUTORIZACION ALGUNA (LISTADO DE MINIMOS)

### Enfermedades hereditarias (general)

- Alport, Síndrome de
- Ataxia de Friedreich
- Ataxias espinocerebelosas
- Atrofia Muscular Espinal
- Charcot Marie Tooth, Enfermedad de
- Distrofia facioescapulohumeral
- Distrofia Miotónica (Steinert)
- Distrofia Muscular de Duchenney de Becker
- Fibrosis Quística
- Hemofilia A y B
- Huntington, Enfermedad de
- Incontinencia Pigmenti

- Marfan, Síndrome de
- Miopatía miotubular
- Osteogénesis imperfecta
- Poliquistosis renal (autosómica dominante y recesiva)
- Retinosis Pigmentaria
- Talasemias
- Wiskott Aldrich, Síndrome de
- X Frágil, Síndrome de

### Enfermedades metabólicas hereditarias con mutaciones definidas

- Adrenoleucodistrofia
  - Gaucher, Enfermedad de
  - Gangliosidosis
  - Hunter, Síndrome de (Mucopolisacaridosis tipo II)
  - Hurler, Síndrome de (Mucopolisacaridosis tipo I)
  - Lesch Nyhan, Síndrome de
- ### Síndromes de Cáncer hereditario
- Anemia de Fanconi
  - Esclerosis Tuberosa 1 y 2
  - Poliposis Adenomatosa familiar
  - Neurofibromatosis 1 y 2
  - Neoplasia Múltiple endocrina 1 y 2
  - von Hippel-Lindau, Síndrome de

## 4- SUGERENCIAS DE ASEBIR PARA LA INCLUSIÓN DE NUEVAS ENFERMEADES

Primera.- Todas las enfermedades monogénicas que no están inicialmente en esta lista pero que cumplan los tres criterios que proponemos a continuación deberían también aceptarse como 12.1.a, sin necesidad de solicitar permiso a las autoridades sanitarias correspondientes ni a la CNRHA.

1.- Que se trate de una enfermedad hereditaria crónica, severa y/o progresiva que genere un grado variable de discapacidad sensorial, motora o intelectual para la que no se disponga de un tratamiento curativo o que comprometa seriamente la calidad de vida.

2.- Que se disponga de un informe Genético donde se especifique el estatus genético de la mujer, pareja o familia consultante en relación a la enfermedad que se va a diagnosticar.

3.- Que exista riesgo genético conocido de transmisión del fenotipo alterado a la descendencia.

Segunda.- Solamente aquellas enfermedades monogénicas que no se incluyan en los apartados anteriores deberán considerarse como 12.2 y en consecuencia requerirán autorización expresa.

**ANEXO 1: ENFERMEDADES MONOGENICAS DIAGNOSTICADAS HASTA LA FECHA, EN ESPAÑA, MEDIANTE DGP (FUENTE: DATOS PROPIOS DEL GRUPO DE INTERÉS EN DGP DE ASEBIR)**

Enfermedad	Herencia	Frecuencia poblacional Orphanet	Edad de inicio o aparición	Penetrancia
Acidemia propiónica	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Aciduria 3hidroxi-3-metilglutárica	autosómica recesiva	Desconocido	Neonatal/infancia	
Acondroplasia	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Adrenoleucodistrofia, ligada al X	ligada al sexo	5 / 100 000	Variable	
Agammaglobulinemia, ligada al X	recesiva ligada al sexo	1-9 / 1 000 000	Neonatal/infancia	
Alfa-sarcoglicanopatía de cinturas con déficit de alfa-sarcoglicano	autosómica recesiva	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Alport, ligada al X	ligada al sexo	1-9 / 100 000	Infancia	
Anemia de Fanconi	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Infancia	
Angioedema hereditario	autosómica dominante	1-9/ 100 000	Variable	
Aniridia (PAX6)	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Ataxia apraxia oculomotora	autosómica recesiva	Desconocido	Infancia	
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	autosómica dominante	0,57 / 100 000	Edad adulta	100% (si viven suficiente)
Ataxia espinocerebelosa tipo 3	autosómica dominante	0,7 / 100 000	Edad adulta	100% (si viven suficiente)
Atrofia muscular espinal enfermedad de Werdnig Hoffmann o atrofia muscular espinal infantil tipo I	autosómica recesiva	10 / 100 000	Neonatal/infancia	
Beta talasemia	autosómica recesiva	2 / 100 000	Neonatal/infancia	
Charcot-Marie-Tooth, CMTX	ligada al sexo	1-5 / 10 000	Infancia en varones/Adulta en hembras portadoras	100% en varones portadores de mutación

Charcot-Marie-Tooth 1A, DEMYELINATING, TYPE 1A; CMT1A	autosómica dominante	32,5 / 100 000	Variable	100% (en función de cuando aparece la sintomatología)
Defecto congénito de la glicosilación (CDG), tipo Ia; CDG1A	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD)	autosómica recesiva	1 / 100 000	Neonatal/infancia	
Déficit de Glutaril-CoA Deshidrogenasa	autosómica recesiva	1-9 / 1 000 000	Neonatal/infancia	
Deficiencia de Ornitina transcarbamilasa (OTC)	recesiva ligada al sexo	2,5 / 100 000	Infancia	
Deficiencia de POR (citocromo P450 oxidoreductasa), Síndrome ANTTLEY-BIXLER-LIKE	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
depleción del ADN mitocondrial (ADNmt) causado por mutación en MPV17	autosómica recesiva	Desconocido	Neonatal/infancia	
Displasia campomélica	Autosómica dominante	Excepcional	Neonatal/infancia	
Displasia ectodérmica, hidrótica (S. Clouston o HED2)	autosómica dominante	1 / 100 000	Infancia	
Displasia epifisaria múltiple tipo 1	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Distonía de torsión	autosómica dominante	4 / 100 000	Infancia	
Distrofia miotónica 1 (Steinert)	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Distrofia muscular Duchenne/Becker	ligada al sexo	5 / 100 000	Infancia	
Distrofia Muscular Emery Dreifuss, AD; EDM2	autosómica dominante	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Distrofia muscular facio-escápulo-humeral	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Drepanocitosis (Anemia falciforme)	autosómica recesiva	1-5 / 10 000	Variable	
Enfermedad de Huntington	autosómica dominante	6,2 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Enfermedad de Fabry	recesiva ligada al sexo	1-9 / 100 000	Infancia	
Enfermedad de Norrie (pseudoglioma)-	recesiva ligada al sexo	Excepcional	Neonatal/infancia	

Epidermolisis bullosa, juntural	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
Esclerosis tuberosa tipo 1 TSC1 CROMOSOMA 9	autosómica dominante	8,8 / 100 000	Variable	
Esclerosis tuberosa tipo 2 TSC2 CROMOSOMA 16	autosómica dominante	8,8 / 100 000	Variable	
Exostosis múltiple hereditaria tipo 1 Exostoses, multiple	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Infancia	
Fibrosis quística	autosómica recesiva	12 / 100 000	Infancia	
Gangliosidosis GM1	autosómica recesiva	Desconocido	Infancia	
Glucogenosis tipo 1A	autosómica recesiva	Desconocido	Neonatal/infancia	
Glucogenosis tipo 2 (Síndrome de Pompe)	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Variable	
Granulomatosis crónica	recesiva ligada al sexo	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Hemofilia A	ligada al sexo	7,7 / 100 000	Infancia	
Hipercolesterolemia familiar	autosómica dominante	>1 / 1000	Variable	
Hiperplasias suprarrenal congénita (HSC) mutación especialmente prevalente Val281Leu	autosómica recesiva	10 / 100 000	??????	
Homocistinúria	autosómica recesiva	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Incontinentia Pigmenti	dominante ligada al sexo	0,2 / 100 000	Infancia	
Inmunodeficiencia severa combinada (RAG2) T- B-	autosómica recesiva	0,35 / 100 000	Neonatal/infancia	
Leucodistrofia metacromático (deficiencia ARSA)	autosómica recesiva	0,16 / 100 000	Variable	
Lipofuscinosis neuronal ceroida tipo 2	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Infancia	
Miocardopatía hipertrófica familiar	autosómica dominante	>1 / 1000	Variable	
Miopatía Miotubular	recesiva ligada al sexo	Desconocido	Neonatal/infancia	
Neoplasia múltiple endocrina: MEN 1	autosómica dominante	11 / 100 000	Variable	
Neoplasia múltiple endocrina: MEN2A	autosómica dominante	3,3 / 100 000	Infancia	

Neurofibromatosis 1	autosómica dominante	25 / 100 000	Variable	
Neuropatía hereditaria con susceptibilidad a parálisis por presión	autosómica dominante	1-9 / 100 000	La edad adulta	
Osteogénesis imperfecta tipo I	autosómica dominante	6,5 / 100 000	Neonatal/infancia	
Osteopetrosis, AR Osteopetrosis, malignant	autosómica recesiva	0,75 / 100 000	Neonatal/infancia	
Parálisis periódica hipocalémica	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Infancia	
Paramiotonía Congénita de VON EULENBURG; PMC	autosómica dominante	Desconocido	adolescencia/edad adulta	
Polineuropatía Amiloidótica Familiar (PAF) o enfermedad de Andrade	autosómica dominante	100 / 100 000	Edad adulta (pobl. Ibérica 33.5+/-9.4a)	Variable
Poliposis adenomatosa familiar	autosómica dominante	5,25 / 100 000	La edad adulta	
Poliquistosis renal, AD PKD1	autosómica dominante	0,11 / 100 000	Variable	
Poliquistosis renal, autosomal recessive	autosómica dominante	6,5 / 100 000	Infancia	
Poliquistosis renal, AD, PKD2	autosómica dominante	0,11 / 100 000	Variable	
Retinosis pigmentaria (gen rodopsina)	autosómica dominante	27,5 / 100 000	Variable (predominantemente adulta)	
Retinosis pigmentaria ligada al X	ligada al sexo		Infancia	
Síndrome de Lynch I	autosómica dominante	0,48 / 100 000	Edad adulta	
Síndrome de Holt-Oram; HOS	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis II)	ligada al sexo	0,6 / 100 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Asperger	multifactorial	20 / 100 000	Infancia	
Síndrome de diGeorge	autosómica dominante	1-5 / 10 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Bruton (agammaglobulinemia ligada al X)	ligada al sexo		Infancia	
Síndrome de Gorlin	autosómica dominante	1-9 / 100 000	adolescencia/edad adulta	
Síndrome de hipersensibilidad a los andrógenos	ligada al sexo	1-5 / 10 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Kell			Neonatal	

Síndrome de Marfan tipo I; MFS1	autosómica dominante	30 / 100 000	Infancia	
Síndrome de Noonan	autosómica dominante	1-5 / 10 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de Peutz-Jeghers	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Variable	
Síndrome de Pfeiffer	autosómica dominante	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Síndrome de von Hippel-Lindau	autosómica dominante	1-9 / 100 000	La edad adulta	
Síndrome de Wiscott-Aldrich	ligada al sexo	0,15 / 100 000	Infancia	
Síndrome de X frágil	ligada al sexo	14,25 / 100 000	Infancia	
S. del gen contiguo (poliquistosis renal /esclerosis tuberosa) OMIM #600273	autosómica dominante	Excepcional	Infancia	
Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X o enfermedad de Duncan	recesiva ligada al sexo	1-9 / 1 000 000	Infancia	
Síndrome de Treacher Collins-Franceschetti	autosómica dominante	6 / 100 000	Neonatal/infancia	
Sordera AR Usher	autosómica recesiva	1-9 / 100 000	Neonatal/infancia	
Tirosinemia	autosómica recesiva	Excepcional	Neonatal/infancia	
Vitreo-Retinopatía Exudativa Familiar	varias	Desconocido	Variable	

## ANEXO 2: TABLA DE RECOGIDA DE DATOS DE DGP ARMONIZADA PARA TODAS LAS CCAA

Encuesta de datos de DGP año 2008.

Centro de TRHA titular de los embriones: \_\_\_\_\_

Centro que realiza el análisis genético (rellenar una tabla para cada centro colaborador en el análisis genético): \_\_\_\_\_

	Enfermedad o alteración a detectar	Indicación más concreta	Núm de casos	Núm de casos sin embriones normales	Núm de transferencias	Núm de embarazos	Núm de nacidos sin la enfermedad o alteración*	
DGP (Ley 14/2006, art. 12. 1,a)	Reorganizaciones cromosómicas (en el hombre)	Translocaciones Robertsonianas						
		Translocaciones Recíprocas						
		Inversiones						
		Aneuploidias de cromosomas sexuales						
	Reorganizaciones cromosómicas (en la mujer)	Translocaciones Robertsonianas						
		Translocaciones Recíprocas						
		Inversiones						
		Aneuploidias de cromosomas sexuales						
	Enfermedades Hereditarias Graves	Autosómicas Recesivas	Fibrosis Quística					
			Talasemias					
			Otras (especificar)					
		Autosómicas Dominantes	Corea de Huntington					
			Distrofia Miotónica					
			Otras (especificar)					
		Ligadas al cromosoma X	Distrofia Muscular de Duchene					
			Hemofilias					
X Frágil								
Otras (especificar)								

Encuesta de datos de PSG año 2008.

Centro de TRHA titular de los embriones: \_\_\_\_\_

Centro que realiza el análisis genético (rellenar una tabla para cada centro colaborador en el análisis genético): \_\_\_\_\_

	Indicación	Núm de casos	Núm casos sin embriones normales	Núm de transferencias	Núm de embarazos	Núm de nacidos sanos*
PGS (Ley 14/2006, art. 12. 1,b)	Test de aneuploidias	Edad Materna Avanzada (AMA, >37a)				
		Fallos previos de implantación (>2 fallos)				
		Abortos previos (>2 abortos no bioquímicos)				
		Factor masculino severo				
		Otras (especificar)				
	Otras (especificar)					

Encuesta de datos de DGP-monogénicas año 2008.

Centro de TRHA titular de los embriones: \_\_\_\_\_

Centro que realiza el análisis genético (rellenar una tabla para cada centro colaborador en el análisis genético): \_\_\_\_\_

DGP-monogénicas	Indicación		Núm de casos	Núm casos sin embriones normales	Núm de transferencias	Núm de embarazos	Num de nacidos sanos*
(Ley 14/2006, art. 12. 2)  Indicaciones que requieren autorización de la CNRHA caso a caso	DGP-HLA	HLA					
		HLA + Monogénica					
	Otras (especificar)						

*Atención:* Los datos de "nacimientos" se refieren al año 2007 y deben corresponderse con los embarazos reportados para el año 2007. El próximo año deberán facilitarse los nacimientos de los embarazos del 2008 que se declaran ahora.

## Sistemas Genómicos compañía líder en análisis de ADN

### Servicio integral de Genética aplicado a la Medicina

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

#### GENÉTICA MÉDICA

Nuevas herramientas diagnósticas para la mejora de su práctica clínica

CONSEJO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL

ENFERMEDADES RARAS

CÁNCER HEREDITARIO

GENÉTICA ONCOHEMATOLÓGICA

ESTUDIOS GENÉTICOS A MEDIDA

#### GENÉTICA REPRODUCTIVA

Una manera sencilla de ofrecer DGP a sus pacientes

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

Detección de aneuploidías  
Determinación del sexo embrionario  
Anomalías cromosómicas estructurales  
Enfermedades monogénicas  
Tipaje HLA

INFERTILIDAD GENÉTICA

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES

CONSEJO GENÉTICO REPRODUCTIVO



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



Solicite nuestro catálogo  
**902 364 669**

# ANIMALES TRANSGÉNICOS Y *KNOCKOUTS*: HERRAMIENTAS CLAVE EN EL ESCLARECIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA INFERTILIDAD FEMENINA

## **TRANSGENICS ANIMALS AND KNOCKOUTS: KEYS ON THE MOLECULAR BASIS OF FEMALE INFERTILITY**

Paloma Sánchez-Aparicio<sup>1</sup>, Sierra Muñoz-García<sup>2</sup>, Jorge Cuadros<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Ginecológico La Cigüeña, Madrid; <sup>2</sup>Unidad de Genómica, Parque Tecnológico UAM, Madrid; <sup>3</sup>Clínica FivMadrid, Madrid

e-mail: aparicio.fiv@gmail.com

Fecha recepción: 29 abril 2010 · Fecha aceptación: 24 mayo 2010

### RESUMEN

Las causas de la infertilidad femenina son múltiples y numerosas. Alteraciones en el reclutamiento folicular, la ovulación, las trompas o la receptividad uterina perturban el proceso reproductivo e impiden la consecución de la gestación. Esclarecer el entramado de mecanismos reguladores y los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso reproductivo ayuda no sólo a profundizar en el conocimiento de la biología reproductiva, sino a la mejora en el tratamiento de los desórdenes de infertilidad cada día más presentes en nuestra sociedad. El uso de animales experimentales como ratones transgénicos y *knockouts* ha demostrado ser en los últimos años una herramienta clave que ha posibilitado un enorme avance científico y tecnológico. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):16-25.

Palabras clave: knock-out, transgénicos, infertilidad

### SUMMARY

The causes of female infertility are multiple and numerous. Disorders of the follicular recruitment, ovulation, fallopian tubes, as well as alterations of the uterine receptivity, disturb the whole reproductive process and prevent the successful achievement of pregnancy. Understanding the network of regulatory mechanisms and the molecular basis of human reproduction can help us not only to deepen our knowledge of reproductive biology, but also to improve the treatment of infertility disorders, more and more frequent nowadays in our society. In the last few years, the use of experimental animals, like 'knock-outs' or transgenic mice, has been proved to be a fundamental tool that has allowed an enormous scientific and technological progress. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):16-25.

Keywords: knock-out, transgenic animals, infertility

### LAS CAUSAS DE LA INFERTILIDAD FEMENINA SON MÚLTIPLES

Estudios epidemiológicos diversos indican que una de cada diez parejas que buscan una gestación no lo consiguen (Boivin et al., 2007). El 40% de las veces son casos de infertilidad femenina, de causas múltiples, tanto anatómicas como funcionales. El proceso reproductivo es complejo y, aunque no es garantía de éxito, son imprescindibles ovarios y trompas funcionales, niveles hormonales adecuados, y una receptividad uterina satisfactoria.

Los ovarios funcionales deben contener un número suficiente de folículos, verdaderas unidades

funcionales del ovario. Cada folículo primordial, formado por un oocito detenido en profase de la primera división meiótica y una única capa de células de la granulosa, debe permanecer en estado de quiescencia hasta recibir la señalización de activación que conduce al crecimiento y maduración folicular y, por último, a la ovulación.

El desarrollo folicular está controlado por un entramado de mecanismos regulatorios endocrinos, autocrinos y paracrinos mediados por hormonas, citoquinas y otros factores solubles. Participan, además, mecanismos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC), así como mecanismos de comunicación

celular a través de uniones tipo *gap junction*. Todos estos mecanismos controlan conjuntamente la activación y el reclutamiento folicular, la dominancia y la supervivencia de sólo algunos folículos, el crecimiento y la diferenciación coordinada de las células de la granulosa y la teca, así como la ovulación. Tras la ovulación, el oocito maduro se encamina hacia el útero a través de las trompas y los folículos vacíos se convierten en cuerpo lúteo.

La fecundación posterior del oocito -si ocurre-, las primeras divisiones celulares y la implantación embrionaria van a depender de la calidad intrínseca del propio oocito. Esta calidad viene definida por las

competencias que el oocito adquiere a lo largo del desarrollo folicular y resulta clave la comunicación bidireccional entre el oocito y las células somáticas circundantes. Más adelante, la interacción del embrión con el útero también va a depender de un proceso bidireccional; se trata de un intenso y complejo proceso de *cross-talk* entre el embrión y el tejido materno, mediado por interacciones celulares directas y por factores solubles que hacen posible la implantación embrionaria.

Como resultado de la complejidad extrema de los mecanismos que conducen a la consecución de la gestación, las alteraciones en el reclutamiento folicular, la ovulación, la permeabilidad de las trompas, la calidad oocitaria o la implantación, pueden perturbar o bloquear el proceso reproductivo. A pesar de la alta incidencia de trastornos asociados a la infertilidad femenina, en las últimas décadas el diagnóstico y tratamiento de estos desórdenes ha progresado enormemente. El avance científico y tecnológico ha permitido el desarrollo de Técnicas de Reproducción Asistida que combinan el uso de terapias hormonales con distintos procedimientos como la inseminación intrauterina, la fecundación *in vitro* y la donación de óvulos o embriones.

#### LOS RATONES TRANSGÉNICOS Y *KNOCKOUTS* SON MUY ÚTILES PARA ESTABLECER LA FUNCIÓN GÉNICA

Una gran parte del avance científico alcanzado en los últimos años ha sido posible gracias al uso de animales de experimentación como ovejas, vacas, monos, ratas y ratones, por citar algunos ejemplos. Estos animales se emplean como herramienta para simular modelos de estudio que permiten poner a punto procedimientos experimentales novedosos y hacen posible establecer los mecanismos moleculares asociados a procesos biológicos humanos, tanto normales como patológicos. El caso del ratón es particularmente interesante puesto que, a pesar de la enorme distancia evolutiva que existe entre esta especie y el hombre, su uso como modelo experimental está

ampliamente extendido, dado que el abismo evolutivo se ve definitivamente compensado por el elevadísimo número de genes que comparten.

En los años ochenta, la generación de ratones transgénicos surgió como una forma novedosa de abordar el estudio de la función de genes concretos. Para obtener un ratón transgénico es necesario, en primer lugar, inyectar un determinado material genético en el pronúcleo masculino de oocitos fecundados. Los cigotos así microinyectados son transferidos al oviducto de hembras pseudo-preñadas y al final de la gestación algunos de los ratones nacidos portan el material genético incorporado en una localización no específica de su genoma. Estos ratones reciben la denominación de transgénicos.

Asimismo, la producción de ratones *knockout* representa otra forma, más precisa aún, de abordar el estudio de la función génica. En este caso es imprescindible el uso de células madre embrionarias, que se emplean como elemento celular para llevar a cabo la inserción del gen modificado. La función de un gen se puede analizar si éste es reemplazado *-knocked out-* por un alelo inactivo en una célula madre que con posterioridad es transferida a un embrión. La célula manipulada genéticamente se integrará en el tejido embrionario dando lugar, más adelante, a distintos tejidos y el resultado final será un ratón *knockout*, donde el gen reemplazado no se expresa. A diferencia de los ratones transgénicos, los ratones *knockout* llevan insertado el gen modificado en una localización precisa de su genoma.

De esta forma, los ratones obtenidos por manipulación genética proporcionan un modelo de experimentación extraordinario que permite determinar la función del gen que ha sido manipulado, así como su relación con determinadas patologías humanas. No obstante, la tecnología de ratones *knockout* presenta limitaciones, puesto que en alrededor del 15% de estos ratones la inactivación del gen de estudio resulta letal durante el desarrollo embrionario y un número incierto

de animales sufren cambios no observables que obviamente carecen de utilidad. También son numerosos los ratones transgénicos que carecen de un fenotipo destacado y no proporcionan información alguna.

#### LOS RATONES GENÉTICAMENTE MANIPULADOS CON FENOTIPO DE INFERTILIDAD SON NUMEROSOS

En 1992, Stewart y colaboradores publicaron un estudio pionero sobre ratones *knockout* viables pero infértiles. Se trataba de ratones *knockout* para el gen que codifica para el factor LIF (*leukemia inhibitory factor*) cuya expresión transitoria aparecía alterada e impedía la implantación embrionaria. Un año después, otro grupo de investigadores generó un ratón con el receptor de estrógenos modificado, cuyas hembras eran incapaces de responder a la hormona estradiol pese a mostrar un fenotipo de aparente normalidad (Lubah et al., 1993).

Con posterioridad, el grupo de Colledge publicó otro trabajo en el que demostraba que los oocitos de hembras mutantes para *c-mos*, un protooncogen que codifica para una quinasa implicada en procesos meióticos, eran incapaces de detener la división meiótica (Colledge et al., 1994). En 1995, se demostró una reducción significativa de la eficiencia de la ovulación en ratones que carecían de los activadores del plasminógeno tPA *-tipo tejido-* y uPA *-tipo uroquinasa-*, indicando así que la activación del plasminógeno juega un papel fundamental en la degradación de la pared folicular durante la ovulación (Leonardsson et al., 1995).

Además, existen ratones *knockout* que aún no teniendo primariamente afectado el sistema reproductor, terminan por presentar un fenotipo de infertilidad. Un caso llamativo es el ratón *knockout* de la enzima aromatasa CYP19, que puso de manifiesto las consecuencias de una deficiente actividad enzimática en el proceso de formación de estrógeno; estos ratones no producían estrógenos y, en consecuencia, presentaban

alterado el desarrollo del útero y los genitales (Fisher et al., 1998). Desde estos resultados pioneros, han sido muchos los trabajos sobre ratones *knockouts* con fenotipo de infertilidad femenina primaria (Edelmann et al., 1996; Nakayama et al., 1996; Lee et al., 1996; Sterneck et al., 1997; Kumar et al., 1997) o secundaria (Pietila et al., 1997; Wu et al., 2003), que en conjunto han permitido entender numerosos mecanismos asociados a la biología reproductiva.

### EL PROCESO DE LA FOLICULOGÉNESIS SE HA PODIDO DETERMINAR GRACIAS AL ESTUDIO DE MODELOS ANIMALES

En particular, el análisis de ratones transgénicos ha permitido comprender en detalle algunos procesos de extraordinaria complejidad, como el establecimiento de las células germinales primordiales (PGCs) durante el desarrollo embrionario. En la actualidad está ampliamente documentada la implicación de las proteínas BMP (*bone morphogenetic protein*), BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) y BMP8 (*bone morphogenetic protein 8*) en este proceso (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000, 2001). Cuando las PGCs alcanzan el esbozo de gónada en el embrión, reciben la denominación de oogonias; allí pierden su movilidad característica y entran en divisiones sucesivas. Este proceso está mediado por las proteínas BMPs que se unen a sus receptores ALK (*type 1 activin receptor-like kinase*), en particular a ALK2, ALK3 o ALK6, induciendo cambios en los patrones de expresión génica vía SMAD5 (Chang and Matzuk 2001; Chen et al., 2004; Chuva de Sousa Lopes et al., 2004). Las moléculas de adhesión también están implicadas en este proceso de migración, según confirman las PGCs carentes de la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas, a las que les resulta imposible interactuar con los componentes de la MEC y entrar en las gónadas (García-Castro et al., 1997; Anderson et al., 1999). De igual modo, la comunicación célula-célula entre las propias células PGCs o entre éstas y las células somáticas a través de *gap junctions* de Cx43 (Juneja et al., 1999) también es importante

para la colonización de las gónadas, así como la interacción entre el factor derivado de células madre (SDF-1) con su receptor CXcr4 (Ara et al., 2003; Molyneaux et al., 2003).

Durante la vida embrionaria, las células germinales que han colonizado las gónadas (oogonias) dejan de dividirse y entran en meiosis para dar lugar a los oocitos. Los oocitos se disponen en *clusters* denominados *germ cell nests*, donde cada uno está íntimamente relacionado con el resto. En un período próximo al nacimiento, los *cluster* de oocitos deben romperse para permitir la formación de los folículos primordiales. Muchos oocitos mueren por apoptosis, y los supervivientes se rodean de células somáticas circundantes dando lugar a los folículos primordiales. Una contribución reveladora sobre este proceso fue la descripción del factor de línea germinal  $\alpha$  (Fig1 $\alpha$ ), específico de oocitos y máximo responsable del control de las interacciones entre el oocito y las células de la granulosa circundantes (Soyal et al., 2000). En este proceso participan igualmente los factores de transcripción FoxI2 o Foxo3a (Schmidt et al., 2003; Castrillon et al., 2003; Batista et al., 2007) al igual que el factor NOBOX, específico de oocitos al igual que Fig1 $\alpha$  que está involucrado en la formación de folículos primarios (Rajkovic et al., 2004). El factor NGF (*nerve growth factor*) también está relacionado, puesto que el ratón transgénico de NGF(-/-) muestra un reducidísimo número de folículos en crecimiento (Dissen et al., 2001). Confirmando estas observaciones, cuando existen alteraciones en su receptor, la tirosina quinasa (Trk), la formación de folículos se ve seriamente comprometida (Donovan et al., 1996; Spears et al., 2003). A su vez, cambios en la expresión de las proteínas específicas de meiosis, como DMC1 o MSH5, evidencian que al menos algunos genes implicados en la meiosis estarían relacionados con la sinapsis cromosómica (Mandon-Pepin et al., 2002).

Lo más significativo es que las observaciones realizadas en modelos animales se corresponden con los datos obtenidos en pacientes humanos

con desórdenes reproductivos. Por ejemplo, se han descrito mutaciones diversas para FoxI2, DMC1 o NOBOX en mujeres con fallo ovárico prematuro, así como alteraciones en Fig1 $\alpha$  (Gersak et al., 2004; Pangas and Rajkovic, 2006; Mandon-Pepin et al., 2002). También se ha demostrado la relación de NGF y la patogénesis del síndrome de ovario poliquístico (Bai et al., 2004), y alteraciones en las proteínas de la zona pelúcida en pacientes que presentaban fallos de fecundación en procedimientos de fecundación *in vitro* (Mannikko et al., 2005). La zona pelúcida, que aparece alrededor del oocito en los folículos primarios, está constituida por las proteínas ZP1, ZP2, ZP3 y desempeñan un papel esencial según demuestran diversos modelos experimentales (Rankin et al., 1996, 1999, 2001).

Los folículos primarios dan lugar a los folículos preantrales, que presentan múltiples capas de células de la granulosa y una capa externa de células de la teca. Gracias a los resultados obtenidos con ratones *knockout*, hoy sabemos que para la formación de folículos preantrales es necesario que las células de la granulosa estén comunicadas entre sí por *gap junctions* de conexina 43 (Cx43), y con el oocito por *gap junctions* de conexina 37 (Cx37). Las *gap junctions* ponen en comunicación citoplasmática directa las células adyacentes, permitiendo el paso de pequeñas moléculas, nutrientes y mediadores solubles, lo que hace posible la sincronización del comportamiento celular (Simon et al., 1997; Ackert et al., 2001). Además, el bloqueo en estadio preantral también se aprecia en los ratones transgénicos deficientes para  $\gamma$ -Glutamil transpeptidasa GGT, enzima responsable de convertir el Glutathione en cisteinil-glicina y ácido  $\gamma$ -glutámico (Kumar et al., 2000).

Continuando con el desarrollo folicular, los folículos preantrales se convierten en folículos antrales, que se caracterizan por tener una cavidad repleta de líquido denominada antro folicular. La mayoría de los folículos antrales terminan siendo atrésicos, y un pequeño porcentaje continua su proceso de maduración. Distintos factores pro-apoptóticos

y anti-apoptóticos que controlan el proceso de atresia son esenciales para la degradación de los folículos antrales, tal como *Bcl2* o *Casps* (Ratts et al., 1995; Matikainen et al., 2001). El resto de los folículos antrales no afectados por atresia crecen hasta el estadio de folículo preovulatorio.

Para que tenga lugar la ovulación, los folículos maduros deben alcanzar la superficie del ovario, las células de la granulosa deben expresar en la membrana receptores para la hormona LH y el oocito debe reactivar la meiosis. Trastornos reproductivos que afectan exclusivamente a la ovulación han sido observados en distintos modelos, como los ratones que carecen del receptor de prostaglandina E (Ep2) (Hizaki et al., 1999); la COX2, enzima responsable de la síntesis de PGs (Matsumoto et al., 2001); ciertos inhibidores de inter- $\alpha$ -tripsina (Suzuki et al., 2004); bikunin protein (Sato et al., 2001) o el factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF) (Jasper et al., 2000; Gilchrist et al., 2000). A posteriori, son muchos los mediadores inflamatorios que están implicados, entre ellos el óxido nítrico (Jablonka-Shariff and Olson 1998).

No hay que olvidar que, durante el desarrollo folicular, el núcleo del oocito sufre modificaciones: condensación de la cromatina, segregación de los cromosomas y extrusión del primer corpúsculo polar. Para concluir la meiosis, la fosfodiesterasa 3A (PDE3A) vía la hidrólisis de cAMP (Masciarelli et al., 2004); el *Ercc1* (*excision repair cross complementation group 1*) (Hsi et al., 2003); el *lunatic fringe* gene (Hahn et al., 2005); los factores de *heat shock* (Hsfs) (Christians et al., 2000); y algunos reguladores de la progresión del ciclo celular como las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), la Cyclin kinasa (CK) y el receptor 3 unido a proteínas G, son de gran importancia (Spruck et al., 2003). Los ratones *Cdk2*<sup>-/-</sup> y *Cdk4*<sup>-/-</sup> muestran también un fenotipo claro de infertilidad (Ortega et al., 2003; Moons et al., 2002).

Además, las células somáticas que acompañan al oocito contribuyen al desarrollo folicular a través de la producción de hormonas esteroideas. Por ejemplo, la proteína esteroideogénica reguladora aguda (STAR) promueve un paso esencial en la ruta de síntesis de esteroides, en particular en el transporte de colesterol dentro de la mitocondria (Caron et al., 1997). El ratón *knockout* de la aromatasa CYP19 (ArKO), ya mencionado, carece de la capacidad para producir estrógenos (Fisher et al., 1998) y otros ratones con alteraciones en la capacidad de responder a progesterona (Lydon et al., 1995) también presentan defectos reproductivos. En las células de la granulosa, la testosterona es aromatizada en estradiol (E2) que, a su vez, estimula la proliferación de las células de la granulosa. Los ratones deficientes en el receptor de estrógenos confirman la importancia del papel esencial del E2 (Lubahn et al., 1993; Krege et al., 1998; Dupon et al., 2000). Resulta interesante comprobar cómo las pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) muestran igualmente alteraciones del receptor de estrógenos (Jakimiuk et al., 2002).

Como ya hemos mencionado, la foliculogénesis también está sujeta al control de factores de crecimiento. Los oocitos expresan en su superficie receptores celulares que pertenecen a la superfamilia del TGF $\alpha$ : tal es el caso de GDF-9 (growth-differentiation factor 9), BMP6 y BMP15; receptores de las inhibinas de las células de la granulosa, activinas, TGF $\alpha$ 1, TGF $\alpha$ 2 y TGF $\alpha$ 3; así como BMP4 y BMP7 de las células de la teca (Matzuk et al., 1992, 1995a, 1995b; Vassalli et al., 1994; Dong et al., 1996; Guo et al., 1998; Cho et al., 2001; Yan et al., 2001; McMullen et al., 2002; Jorgez et al., 2004; Dixit et al., 2006)

La inactivación funcional de GDF9, que conserva una gran homología con BMP-15, es esencial en la foliculogénesis. Las hembras de ratones deficientes para GDF9 sólo presentan folículos primordiales en la superficie del ovario, el desarrollo folicular no va más

allá y en consecuencia los oocitos degeneran con rapidez (Dong et al., 1996). Además, se puede observar un incremento en los niveles de expresión de kit ligand e inhibina (Carabatsos et al., 1998; Elvin et al., 1999). Asimismo, la ausencia de inhibina interfiere con el estadio tardío de foliculogénesis, según se aprecia en distintos modelos murinos experimentales (Matzuk et al., 1992; Vassalli et al., 1994; Matzuk et al., 1995a, 1995b). Las hembras de ratones que carecen de FSH sufren un bloqueo temprano a nivel de estadio preantral (Kumar et al., 1997), mientras que en las hembras que carecen del receptor tipo II de activina (ActRII) el defecto es tardío, presentando un déficit de folículos antrales, atresia folicular y un cuerpo lúteo de morfología extraña. Consistente con el papel esencial de este receptor en la pituitaria anterior, los niveles de FSH se vieron reducidos (Matzuk et al., 1995a)

La ruta de señalización de TGF $\beta$  implica las proteínas SMAD. A este grupo pertenece la molécula Smad3, que se ha descrito como elemento clave en la foliculogénesis (Zhu et al., 1998; Datto et al., 1999; Tomic et al., 2002, 2004). Las células de la granulosa también sintetizan hormona antimulleriana (AMH), que inhibe el reclutamiento de los folículos primordiales y disminuye la respuesta de los folículos en crecimiento a la FSH. Los ratones con sobreexpresión de AMH y AMHKO son infértiles y han contribuido a clarificar el papel desempeñado por la AMH (Berhinger et al., 1990, 1994; Durlinger et al., 1999, 2001).

Junto con los factores autocrinos y paracrinos, los elementos reguladores endocrinos juegan también un papel esencial en la foliculogénesis, en particular en los estadios tardíos de este proceso. Este es el caso de las hormonas FSH y LH producidas en la pituitaria anterior. Los ratones que carecen de la capacidad de secretar o responder a FSH revelan que esta hormona es necesaria para el crecimiento folicular hasta los estadios antral y preovulatorio (Kumar et al., 1997; Dierich et al., 1998; Abel et al., 2000, 2003); y los ratones

transgénicos con sobreexpresión de FSH presentan niveles elevados de esteroides que producen quistes ováricos y causan infertilidad (Kumar et al., 1999). Por otra parte, los ratones con un fenotipo ovárico incapaz de responder a la hormona LH confirman que para los estadios tardíos de maduración folicular y ovulación, la hormona LH es absolutamente necesaria (Lei et al., 2001; Chudgar et al., 2005; Pakarainen et al., 2005a, 2005b), mientras que aquellos que mantienen crónicamente niveles elevados de LH muestran una cantidad aumentada de progesterona, testosterona y E2, así como un fenotipo de infertilidad (Risma et al., 1995). Además, Meehan et al., en 2005 reportaron un modelo de ratón con activación crónica del receptor de la LH y un desarrollo sexual muy temprano.

Por otra parte, las citoquinas también son esenciales en el éxito de los procesos reproductivos, tanto de manera directa como indirecta, a través de la tolerancia y la supresión inmunológica. Convencionalmente, las citoquinas son factores solubles que median la señalización celular en el contexto del sistema inmune y agrupan a las interleucinas (ILs), factor necrosis tumoral (TNF) y factor estimulante de colonias. Sin embargo, algunos factores de crecimiento como los TGFs y hormonas endocrinas como la hormona del crecimiento (GH), considerados ahora como citoquinas y, por tanto, desempeñando una misma función, como la IL1 y TNF $\alpha$ , participan en la señalización célula-célula dentro del ovario, en concreto entre el oocito y las células circundantes, y otras como el INF- $\gamma$  y GM-CSF, producidos por macrófagos residentes en el ovario, promueven el desarrollo del oocito (ver revisión en Wu et al., 2004; Knight and Glister 2006). También es interesante que las hembras de ratones *knockout* de TGF-1, obtenidas en un *background* de inmunodeficiencia, muestran una función ovárica afectada (Ingman et al., 2006).

Las activinas, muy relacionadas con el TGF- $\beta$  están también implicadas

en la biología del ovario y en un estadio más tardío como el desarrollo de la placenta y la deciduización del endometrio (Qu and Thomas 1995; Caniggia et al., 1997; Tierney and Giudice 2004). Las hembras de ratones que carecen de CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1) y GM-CSF (Granulocyte Macrophage-CSF), ambas citoquinas, exhiben un defecto en la función reproductiva (Araki et al., 1996, 2001; Cohen et al., 2002).

Como ya hemos mencionado, para que tenga lugar la implantación embrionaria, la expresión de LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) es obligada, como queda demostrado en el fallo de la unión del blastocisto al endometrio en los ratones *knockout* para LIF (Stewart et al., 1992) e incluso un fenotipo más severo obtenido cuando el receptor específico de LIF es anulado (Ware et al., 1995).

En un trabajo reciente, el análisis del ratón transgénico con sobreexpresión para el factor de transcripción Foxj2 reveló su infertilidad (Martin de Lara et al., 2008). Los embriones anormales fueron rápidamente reabsorbidos dentro del tejido decidual. En el mismo trabajo se describen dos genes diana: el gen que codifica para la proteína de *gap junction* Cx43 y el gen que codifica para la molécula de adhesión Cadherina-E (Cad-E). Es de sobra conocido que la Cx43 juega un papel esencial en el desarrollo folicular del ratón, siendo la conexina más ampliamente expresada en el endometrio, y además se sabe que es importante en distintas patologías y procesos fisiológicos como la implantación embrionaria (Jahn et al., 1995; Granot et al., 2000; Gabriel et al., 20004; Tanmahasamut et al., 2005; Grümmer et al., 1996, 2004). Por otra parte, la Cad-E, una proteína implicada en los eventos de adhesión celular y que media el proceso de compactación en el desarrollo preimplantatorio de ratones, es también importante para el tránsito desde mórula compactada a la formación del blastocisto, asegurando por tanto el correcto establecimiento de uniones tipo *gap junction* en el trofoectodermo (Peyriéras et

al., 1983; Larue et al., 1994; Kan et al., 2007). Parece razonable cuestionarse si las irregularidades en la regulación transcripcional de los niveles de Cx43 y Cad-E pueden comprometer alguno de los siguientes procesos: maduración oocitaria, desarrollo temprano, proceso de implantación y, por tanto, la capacidad reproductiva femenina. El fenotipo de infertilidad observado en los ratones transgénicos de Foxj2 podría ser la consecuencia natural de una expresión desregulada de Cx43 y Cad-E a nivel transcripcional, debido a la sobreexpresión de Foxj2 (Martin et al., 2008).

Más recientemente, SGOL2 (Shungosin-2) se ha descrito como una proteína esencial para proteger la cohesión centromérica durante la meiosis, con la afectación del gen codificante SGOL2 conduciendo a la formación de gametos aneuploides y a la infertilidad (Llano et al., 2008). Además, se ha observado que la acción de MAPK3/1 (ERK1/2) (*Extracellular signal-Regulates Kinases 1 and 2*) en las células de la granulosa del ovario es absolutamente necesaria para la reiniciación de la meiosis, así como para la ovulación y más tarde la luteinización (Fan et al., 2009).

## CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo hemos presentado numerosos ejemplos de modelos de animales transgénicos y *knockout* que en la última década han contribuido a esclarecer en mayor o menor medida cuáles son los mecanismos que conducen a la activación folicular, la dominancia y la supervivencia de algunos de estos folículos, la reiniciación de la meiosis en el oocito y el proceso de crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa acompañantes. Los resultados obtenidos han ayudado a definir mejor la función ovárica, su control por factores extraovario e intraovario, así como los procesos biológicos implicados en la preimplantación/implantación y en el desarrollo embrionario temprano. Todo ello ha conducido a un importante avance en este área de investigación biomédica,

que es de esperar se acelere en los próximos años con el diseño de nuevos modelos animales y las continuadas mejoras técnicas en el proceso de obtención de transgénicos y *knockout*, que muy posiblemente permitirán una mayor eficiencia en la identificación de los agentes involucrados en la infertilidad femenina y en la determinación del papel que éstos desempeñan.

Sin embargo, aún habiendo contribuido enormemente todos estos hallazgos a la comprensión de las bases moleculares de la reproducción humana, estamos aún lejos de aplicar este conocimiento de una forma directa y efectiva a la mejora de los tratamientos de infertilidad femenina de una forma rutinaria. No sólo porque en el campo de la manipulación genética quedan muchos mecanismos moleculares por determinar, sino porque también falta un verdadero abordaje molecular del tratamiento reproductivo. Es de esperar que en un futuro próximo la aplicación de terapias individualizadas en el contexto de la medicina traslacional sean más y más comunes para resolver los problemas de infertilidad. La determinación de perfiles de expresión génica para mejorar el diagnóstico y tratamiento de mujeres afectadas por problemas de infertilidad puede revolucionar la medicina reproductiva en este sentido.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 2000; 141: 1795- 1803
- Abel MH, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Charlton HM. Age-related uterine and ovarian hypertrophy in FSH receptor knockout and FSHb subunit knockout mice. *Reproduction* 2003; 125: 165- 173
- Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol* 2001; 233: 258- 270
- Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J and Wylie. Mouse primordial germ cells lacking  $\beta 1$  integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 1999 ; 126: 1655- 1664
- Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, Matsui Y, Nagasawa T. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor -1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5319- 5323
- Araki M, Fukumatsu Y, Katabuchi H, Shultz LD, Takahashi K, Okamura H. Follicular development and ovulation in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice homozygous for the osteopetrosis (op) mutation. *Biol Repro* 1996; 54: 478- 484
- Bai YH, LIM SC, Song CH, Bae CS, Jin CS, Choi BC, Jang CH, Lee SH, Pak SC. Electroacupuncture reverses nerve growth factor abundance in experimental polycystic ovaries in the rat. *Gynecol Obst Invest* 2004; 57: 80 -85
- Batista F, Vaiman D, Dausset J, Fellous M, Veitia RA. Potential target of FOXL2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 3330- 3335
- Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature* 1990; 345: 167- 170
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994; 79: 415- 425
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506-1512
- Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology* 1997; 138: 3976- 3986
- Carabatsos MJ, Elvin JA, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor -9-deficient mice. *Dev. Biol.* 1998; 203: 373-384
- Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11540- 11545
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, Depinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003; 301: 215-218
- Chang H and Matzuk MM. Smad 5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 2001; 104: 61-67
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22: 233-241
- Cho BN, McMullen ML, Pei L, Yates CJ, Mayo KE. Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin-subunit gene. *Endocrinology* 2001; 142: 4994- 54004
- Chudgar D, Lei Z, Rao ChV. Orthotopic transplantation of LH receptor knockout and wildtype ovaries. *Life Sci* 2005; 77: 2656- 2662
- Chuva de Sousa Lopes SM, Roclen BA, Monteiro RM, Emmems R, Lin HY, Li E, Lawson KA and Mummery CL. Connective tissue growth factor expression and Smad signalling during mouse heart development and myocardial infarction. *Dev Dyn* 2004; 231: 542- 550
- Cohen PE, Zhu L, Nishimura K, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 regulation of neuroendocrine pathways that control gonadal function in mice. *Endocrinology* 2002; 143: 1413- 1422
- Collidge WH, Carlton MB, Udy GB, Evans MJ. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of fertilized mouse eggs. *Nature* 1994; 370: 65-68

- Christians E, Davis AA, Thomas SD, Benjamin IJ. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 2000; 407: 693–694
- Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2495–2504
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Cori P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signalling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13612–13617
- Di Giacomo M, Barchi M, Baudat F, Edelmann W, Keeney S, Jasin M. Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 737–742
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2078–2086
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakrabarty B, Singh L. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet* 2006; 119: 408–415
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531–535
- Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead. Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 1996; 14: 210–213
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531–535
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound *knockouts* of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; 127: 4277–4291
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789–5796
- Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar Tr, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA et al. Anti-Mullerian hormones attenuates the effects on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891–4899
- Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, Uman A, Kunkel T, Cattoretti G, Chaganti R, Pollard JW, Kolodner RD, Kuchelapati R. Meiotic pachytene in MLH1-deficient mice. *Cell* 1996; 85(7): 1125–1134
- Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor-9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1018–1034
- Fan H, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 2009; 324: 938–941
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6965–697
- Garcia-Castro MI, Anderson R, Heasman J, Wylie. Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J Cell Biol* 1997; 138: 471–480
- Gersak K, Harris SE, Smale WJ, Shelling AN. A novel 30 bp deletion in the FOXL2 gene in a phenotypically normal woman with primary amenorrhoea: Case report. *Human Reprod* 2004; 19: 2767–2770
- Gilchrist RB, Rove DB, Ritter LJ, Robertson SA, Norman RJ, Armstrong DT. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor deficiency on ovarian follicular cell function. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 283–292
- Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 96–106
- Hahn KL, Johnson J, Beres BJ, Howard S, Wilson-Rawls. Lunatic fringe null female mice are infertile due to defects in meiotic maturation. *Development* 2005; 132: 817–828
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N et al. Abortive expansion of the cumulus and impaired infertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10501–10506
- Hsia KT, Millar MR, King S, Selfridge J, Redhead NJ, Melton DW, Saunders PT. DNA repair gene *Erc1* is essential for normal spermatogenesis and oogenesis and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse. *Development* 2003; 130: 369–378
- Ingman WV, Robker RL, Woittiez K, Robertson SA. Null mutation in transforming growth factor beta 1 disrupts ovarian function and causes oocyte incompetence and early embryo arrest. *Endocrinology* 2006; 147: 835–845
- Jablonka-Shariff A and Olson LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 2944–2954
- Jakimuik AJ, Weitsman SR, Yen HW, Bogusiewicz M, Magoffin DA. Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5532–5538
- Jasper MJ, Robertson SA, Van der Hoek KH, Bonello N, Brannstrom M, Norman RJ. Characterization of

ovarian function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod* 2000; 62: 704- 713

Jorgez CJ, Klysik M, Jamin SP, Behrinh RR, Matzuk MM. Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 953- 967

Juneja SC, Barr KJ, Enders, GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 1999; 60: 1263- 1270

Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191- 206

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15677- 15682

Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15: 201- 204

Kumar TR, Palapattu G, Wang P, Woodruff TK, Boime I, Byrne MC, Matzuk MM. Transgenic models to study gonadotropin function: the role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 851- 865

Kumar TR, Wiseman AL, Kala G, Kala SV, Matzul MM, Lieberman MW. Reproductive defects in  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology* 2000; 141: 4270-4277

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13: 424-436

Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff, Polish JA, Goda P, Gavrulina , Milbrandt J. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Erg-1). *Science* 1996; 273: 1219-1221

Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 184- 200

Leonardsson G, Peng XR, Liu K, Nordstrom L, Carmeliet P, Mulligan R, Collen D, Ny T. Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plasminogen activator gene function: functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12446- 12450

Llano E, Gómez R, Gutiérrez-Caballero C, Herrán Y, Sánchez-Martín M, Vázquez-Quinones L, Hernández T, de Alava, E, Cuadrado A, Barbero JL, Suja JA, Pendás AM. Shugosin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev* 2008; 22: 2400- 2413

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertion disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11162- 11166

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9: 2266- 2278

McMullen ML, Cho BN, Yates CJ, Mayo KE. Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin  $\alpha$ -subunit. *Endocrinology* 2001; 142: 5005- 5014

Mandon-Pepin B, Debois C, Mastsuda F, Cotinot C, Wolgemuth DJ, Smith K, McElreavey K, Nicolas A, Fellous M. Human infertility: meiotic genes as potential candidates. *Gynecol Obstet Fertil* 2002; 10: 817-821

Mannikko M, Tormala RM, Tuuri T, Haltia A, Martikainen H, Ala-Kokko L, Tapanainen JS, Lakkakorpi JT. Association between sequence variations in genes encoding human pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. *Human Reprod* 2005; 20(6): 1578 -1585

Martin-de-Lara F, Sánchez-Aparicio P, Arias de la Fuente C, Rey-Campos J. Biological effects of FoxJ2 over-expression. *Transgenic Res* 2008; 17: 1131- 1141

Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M, Manganiello V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest* 2004; 114: 196- 205

Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signalling in the ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2468 -2480

Matsumoto H, Ma W, Smalley W, Trzaskos J, Breyer RM, Dey SK. Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. *Biol Reprod* 2001; 64: 1557- 1565

Matzuk MM, Finegold MJ, Su J-GJ, Hsueh AJW, Bradley, A.  $\alpha$ -Inhibin is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360: 313-319

Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. Different phenotype for mice deficient in either activins or activins receptor type II. *Nature* 1995a; 374: 356-360

Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, Bradley A. Functional analysis of activins in mammalian development. *Nature* 1995b; 374: 354-356

Meehan TP, Harmon BG, Overcast ME, Yu KK, Camper SA, Puett D, Narayan P. Gonadal defects and hormonal alterations in transgenic mice expressing a single chain human chorionic gonadotropin-lutropin receptor complex. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 489- 503

Molyneaux KA, Zinsner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 2003; 130: 4279 -4286

Moons Y, Jirawatnotai S, Tsutsui T, Franks R, Parlow AF, Hales DB, Gibori G, Fazleabas AT, Kiyokawa H. Intact follicular maturation

- and defective luteal function in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology* 2002; 143: 647- 654
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horli I, Loh DY, Nakayama K. Mice lacking p27(kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996; 85: 707- 720
- Ottolenghi C, Omari S, García-Ortiz JE, Uda M, Crisponi L, Forabosco A, Pilia G, Schlessinger. FoxI2 is required for commitment to ovary differentiation. *Human Mol Genet* 2005; 15: 2053-2062
- Ortega S, Prieto I, Odakima J, Martin A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 2003; 35: 25 -31
- Pangas SA and Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum Rep Update* 2006; 12: 65 -76
- Pietila M, Alhonen L, Halmekyto M, Kanter P, Janne J, Porter CW. Activation of polyamine catabolism profoundly alters tissue polyamine pools and affects hair growth and female fertility in transgenic mice overexpressing spermidinase. *J Biol Chem* 1997 ; 272: 18746- 18751
- Pakarainen T, Zhang FP, Nurmi L, Poutanen M, Huhtaniemi I. Knockout of luteinizing hormone receptor abolished the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. *Mol Endocrinol* 2005a; 19: 2591- 2602
- Pakarainen T, Zhang FP, Poutanen M, Huhtaniemi I. Fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action. *J Clin Invest* 2005b; 115: 1862- 1868
- Qu J, Thomas K. Inhibin and activin production in human placenta. *Endocr Rev* 1995; 16: 485- 507
- Rajkovic A, Panga SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; 305: 1157 -1159
- Rankin T, Familari m, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. Mice homozygous for an insertional mutation in the zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996; 122: 2903 -2910
- Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 1999; 126: 3847 -3855
- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 2001; 128: 1119 - 1126
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995; 136: 3665- 3668
- Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH. Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1322- 1326
- Robertsons SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod* 1999; 60: 251- 261
- Robertsons SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2001; 64: 1206- 1215
- Sato H, Kajiwara S, Kuroda S, Horisawa Y, Nakamura N, Kaga N, Nakinuma C, Kato K, Morishita H, Niwa et al. Impaired fertility in female mice lacking urinary trypsin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1154- 1160
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385: 525-9
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S., Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor FoxI2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 2003; 131: 933-942
- Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGa, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000; 127: 4645- 4654
- Spears N, Molinek MD, Robinson LL, Fulton N, Cameron H, Shimoda K, Telfer EE, Anderson RA, Price DJ. The role of neurotrophin receptors in female germ-cell survival in mouse and human. *Development* 2003; 130: 5481- 5491
- Spruck CH, De Miguel MP, Smith AP, Ryan A, Stein P, Schultz RM, Lincoln AJ, Donovan PJ, Reed SI. Requirements of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science* 2003; 300: 647 -650
- Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 1997; 11: 2153-2162
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992; 359: 76-79
- Suzuki M, Kobayashi H, Tanaka Y, Kanayama N, Terao T. Reproductive failure in mice lacking inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI)-ITI target genes in mouse ovary identified by microarray analysis. *J Endocrinol* 2004; 183: 29- 38
- Tierney EP, Giudice LC. Role of activin A as a mediator of in vitro endometrial stromal cell decidualization via the cyclic adenosine monophosphate pathway. *Fert Steril* 2004; 81: 899- 903
- Tomic D, Brodie SG, Deng C, Hickey JK, Malkas LH, Flaws JA. Samd3 may regulate follicular growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2002; 66: 917- 923

Tomic D, Miller KP, Kenny HA, Woodruff TK, Hoyer P, Flaws JA. Ovarian follicle development requires Smad3. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2224- 2240

Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HAR, Lee K-F, Jaenisch R. Activin/inhibins bB subunit disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Gene Dev* 1994; 8: 414-427

Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, et al. Targeted disruption of the low-affinity leukaemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 1995; 121: 1283- 1299

Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. *Human Reprod Update* 2004; 10: 119- 133

Wu X, Viveiros M, Eppig J, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature Genet* 2003; 33: 187-191

Yamada Y and Coffman CR. DNA damage-induced programmed cell death. Potential roles in germ cell development. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1049: 9- 16

Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, et al. Synergistic roles of bone morphogenic

protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 854- 866

Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1053-1063

Ying Y and Zhao GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 2001; 232: 484- 492

Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 1998; 94: 703- 714

**OLYMPUS**

Your Vision, Our Future



## La calidad, nuestro objetivo

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

**Nuevos Sistemas Olympus IMSI**  
**Evalúe la morfología del espermatozoide a altos aumentos con el mismo microscopio de ICSI**



### OCTAX polarAIDE

OCTAX polarAIDE evaluación automática de la calidad de los ovocitos  
 Visualización del huso y comprobación de la viabilidad de congelado-descongelado de los ovocitos en metafase II



### pH Online™

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



### OCTAX Laser Shot™

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

**CTAX**



HTF  
HTF Hepes  
Aceites

Gradientes  
PVP  
PGD

Acido Tiroses  
Hialuronidasa



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

**NUEVO**

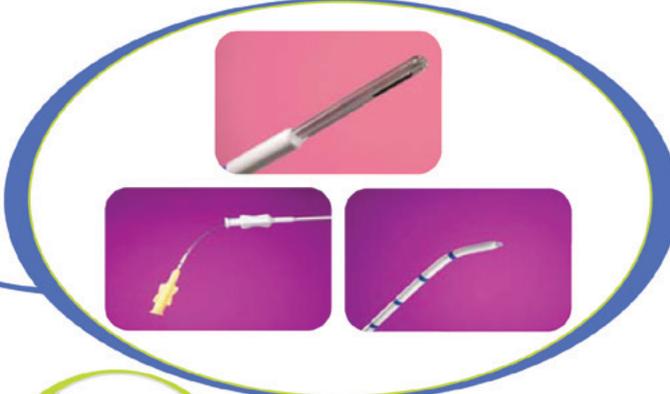
- Albumina con factor de crecimiento  $\alpha$  y  $\beta$  Globulinas
- Sistema Global S3 para Vitrificación de Blastocistos



Pipetas ICSI



Catéter de Transferencia Ecogénico



Agujas de punción OPS



Incubador CO2



Termometro FIV



Medidor de PH



Estaciones de trabajo



Mesas Antivibratorias



Placas Calefactadas



Selladora por ultrasonidos



Baño en seco



Centrifuga FIV

# VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO EN DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO

## VITRIFICATION OF DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES OF BOVINE BLASTOCYSTS PRODUCED IN VITRO

Roser Morató<sup>1</sup>, Dolors Izquierdo<sup>2</sup>, Maria Teresa Paramio<sup>2</sup>, Teresa Mogas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina y Cirugía Animales.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès (Barcelona)

e-mail: teresa.mogas@uab.es

Fecha recepción: 5 mayo 2010 · Fecha aceptación: 25 mayo 2010

### RESUMEN

Se diseñaron dos experimentos para determinar la capacidad de los blastocistos bovinos producidos *in vitro* para sobrevivir a un proceso de vitrificación en diferentes etapas de su desarrollo. Los embriones se clasificaron en blastocistos no expandidos, expandidos o eclosionando/eclosionados tras 7 u 8 días de cultivo embrionario *in vitro*. En el primer experimento, se evaluó el porcentaje de supervivencia de los blastocistos vitrificados/calentados tras 3 horas de incubación en el medio SOF. En el segundo experimento, los blastocistos vitrificados/calentados fueron fijados en paraformaldehído e incubados con tinción de TUNEL para detectar el índice de integridad del DNA. El porcentaje de blastómeros TUNEL positivo y negativo fue evaluado por la microscopía confocal. Cuando se analizaron los resultados según la etapa del desarrollo embrionario tras 7 días de cultivo, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia después de vitrificar blastocistos expandidos (79,1 %) o eclosionados (73,7 %). Cuando los embriones fueron vitrificados en el día 8, se obtuvieron porcentajes de supervivencia del 53,5 % y el 54,4 % tras el calentamiento de blastocistos expandidos o eclosionados, respectivamente. La supervivencia siempre fue significativamente inferior tras la vitrificación de blastocistos no expandidos, en particular en los vitrificados a día 8 post-inseminación ( $\leq 28\%$ ). Los porcentajes de supervivencia obtenidos tras 7 días de cultivo embrionario fueron significativamente superiores a los obtenidos tras 8 días, con independencia del estadio de desarrollo valorado. El índice de integridad del ADN que presentaban los blastocistos tras un proceso de vitrificación/calentamiento fue similar al de los blastocistos control, independientemente de la duración del cultivo embrionario o de la etapa del desarrollo de los blastocistos. Estos resultados sugieren que la vitrificación de embriones bovinos, utilizando el cryotop como soporte, es particularmente útil para la crioconservación de blastocistos que presenten un alto grado de expansión (expandidos o eclosionados), principalmente cuando la vitrificación se lleva a cabo tras 7 días de cultivo embrionario *in vitro*. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):27-33.

Palabras clave: vaca, maduración, fecundación, crioconservación, cryotop, apoptosis

### SUMMARY

Two experiments were designed to determine the ability of *in vitro* cultured blastocysts at different stages of development to survive the vitrification procedure. Day 7 and day 8 embryos were classified as blastocysts, expanded blastocysts, or hatching/hatched blastocysts. In the first experiment, we examined the survival rate of the vitrified/warmed blastocysts after 3h incubation in SOF medium. In the second experiment, vitrified/warmed blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde and were incubated with TUNEL staining for detecting DNA damaged nuclei. The percentage of TUNEL positive and negative blastomeres was assessed by confocal microscopy. When the results according to the developmental stage were analysed, no differences in the survival rates after vitrification of expanded (79.1%) and hatched blastocysts (73.7%) were observed at Day 7. When embryos were vitrified at Day 8, survival rates of 53.5% and 54.4% were observed after warming expanded and hatched blastocysts. The lowest survival rates were observed in non expanded blastocysts, particularly in those vitrified at Day 8 ( $\leq 28\%$ ). Survival rates from blastocysts vitrified after 7 days of embryo culture were significantly higher than those obtained after 8 day, independently of the embryo developmental stage. DNA integrity index obtained after the vitrification/warming process was comparable to those from control fresh blastocysts, independently of the length of the embryo culture or the developmental stage of the blastocyst. These findings suggest bovine blastocyst vitrification, using the cryotop as a support, seems to be particularly useful for blastocysts presenting a high degree of expansion (expanded and hatched blastocysts), mainly when the vitrification is carried out after 7 days of *in vitro* embryo culture. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):27-33.

Key words: cow, maturation, fertilization, cryopreservation, cryotop, apoptosis

## INTRODUCCIÓN

Con los recientes avances en los protocolos de crioconservación, la crioconservación de blastocistos se ha convertido en una herramienta fácil y fiable para preservar aquellos embriones que han expresado su máximo potencial de desarrollo *in vitro* (Menezo, 2004). A pesar de que la congelación lenta continua siendo la técnica más utilizada para la crioconservación de los embriones bovinos producidos *in vivo* o *in vitro*, la vitrificación ha surgido en la última década como una alternativa prometedora y es, en la actualidad, el método de elección debido a que es un procedimiento rápido que no requiere de equipo especial y proporciona buenos resultados en diferentes especies (Berthelot et al., 2000; Vajta et al., 1998) y especialmente cuando se trabaja con ovocitos o embriones producidos *in vitro* o micromanipulados (Pereira et al., 2008). La vitrificación utiliza soluciones de agentes crioprotectores (CPAs) con concentraciones muy elevadas, que provocan un incremento de la viscosidad de las soluciones provocando la formación de un estado sólido amorfo semejante al vidrio. Debido al uso de estas elevadas concentraciones de CPAs, el contacto de las células con los CPAs y las tasas de enfriamiento deben ser lo suficientemente rápidas para evitar los efectos tóxicos y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar al embrión.

Hasta la actualidad, se han descrito diferentes dispositivos como soportes para la vitrificación de embriones preimplantacionales y su posterior almacenaje. Entre ellos, citar las rejillas de microscopia electrónica (*EM grids*), las *open pulled straws* (*OPS*) y los sistemas Cryoloop, Cryotop, Cryoleaf, Cryotip, nylon mesh y metal mesh, entre otros. Estos dispositivos se desarrollaron con el objetivo de maximizar la velocidad de enfriamiento utilizando volúmenes de solución muy pequeños, proporcionando resultados desiguales de supervivencia y desarrollo embrionario tras su utilización (revisado por Vajta and Kuwayama, 2006).

La criotolerancia de los embriones obtenidos *in vitro* es mucho menor a la de los embriones obtenidos *in vivo* (Rizos et al., 2002). Se cree que esta diferencia

puede depender bien de las condiciones de cultivo, especialmente cuando el medio de cultivo contiene suero que provoca una excesiva acumulación de lípidos durante el desarrollo embrionario (Rizos et al., 2003), o bien del estadio de desarrollo en el que son conservados. La crioconservación de embriones en fase de blastocisto es todavía un reto debido a sus características inherentes, tales como: 1) la penetración lenta de los CPAs en el blastocisto, en gran parte debido a su naturaleza multicelular, 2) la zona pelúcida (ZP), que actúa como una barrera fisiológica a la penetración de los CPAs, y 3) la presencia del blastocele. Diferentes autores realizaron la vitrificación de embriones bovinos en estadio de blastocisto expandido debido a que en este estadio la ZP es más delgada y permite mejor la penetración de los CPAs que en el estadio de blastocisto temprano (Rios et al., 2010; Sommerfeld y Niemann, 1999) mientras que otros autores abogan por la vitrificación de embriones en estadio de blastocisto temprano, pues consideran que el incremento de tamaño del blastocele de los blastocistos expandidos favorece la formación de cristales de hielo y, por tanto, de lesiones celulares durante la vitrificación (Cho et al., 2002; Vanderzwalmen et al., 2002). Por otra parte, diferentes estudios, como los de Hiraoka y colaboradores (2007) o Zech y colaboradores (2005) en embriones humanos, observaron que la rotura de la ZP mejoraba los porcentajes de gestación después de vitrificar embriones eclosionados, ya que, y según apuntan estos autores, la rotura de la ZP favorece la exposición del blastocele a los CPAs y facilita tanto la deshidratación como la posterior hidratación de éste.

La apoptosis es una respuesta celular a las condiciones subóptimas y a los diferentes tipos de estrés que un embrión puede sufrir durante el proceso de crioconservación. La viabilidad de los embriones y su potencial de desarrollo se han relacionado con la proporción entre el número de blastómeros con el DNA dañado (TUNEL positivo) y el número total de blastómeros, conocido como el índice de apoptosis, observándose un mayor índice de apoptosis en embriones de menor calidad. La evaluación de la fragmentación del DNA mediante [TdT]-

dUTP nick (TUNEL) ha sido utilizada como un método fiable para la detección de la apoptosis en los embriones. Hasta la actualidad, existen pocos informes sobre los cambios producidos en los índices de apoptosis de los blastocistos bovinos en respuesta a los procesos de vitrificación/calentamiento (Behr et al., 2002; Pomar et al., 2005).

En estudios previos realizados por Morató y colaboradores (2008), se puso a punto con éxito el uso del cryotop como soporte para la vitrificación de ovocitos bovinos madurados *in vitro*, siendo éste el soporte que se utiliza de forma rutinaria en nuestro laboratorio. En el estudio que nos ocupa, se evaluó la capacidad de blastocistos bovinos producidos *in vitro* para sobrevivir a un proceso de vitrificación/calentamiento. Para ello, se vitrificaron los blastocistos en diferentes fases de desarrollo embrionario obtenidos tras 7 u 8 días de cultivo *in vitro*. Nuestro trabajo también fue diseñado para determinar los efectos que la fase de desarrollo o la duración del cultivo *in vitro* podían provocar sobre las tasas de fragmentación del DNA de embriones sometidos a un proceso de vitrificación/calentamiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos y los reactivos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### *Obtención de los ovocitos y maduración in vitro*

Para la producción *in vitro* de embriones, se ha seguido el protocolo descrito previamente por Rizos y colaboradores (2001). Para la obtención de ovocitos, se obtuvieron ovarios de hembras sacrificadas en un matadero local cercano a la Facultad de Veterinaria (UAB) y se transportaron al laboratorio en una solución salina tamponada (Phosphate Buffered Medium; PBS) a 35-37 °C. Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) se obtuvieron mediante aspiración de aquellos folículos que presentaban un diámetro comprendido entre 2 y 10 mm. Después de tres lavados en PBS modificado (PBS suplementado con 36 mg/ml de piruvato sódico, 50 mg/ml de gentamicina y 0,5 mg/ml de

albúmina sérica bovina (BSA)), grupos de hasta 50 COCs se colocaron en 500  $\mu$ l de medio de maduración en placas de cuatro pocillos y se cultivaron durante 24 horas a 38,5 °C, en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad. El medio de maduración estaba compuesto por medio TCM199 suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (Fetal Calf Serum, FCS), 10 ng/ml de epidermal growth factor y 50 mg/ml de gentamicina.

### **Fecundación *in vitro***

Para la fecundación *in vitro*, los COCs se lavaron cuatro veces en PBS y después en el medio de fecundación, antes de ser colocados, en grupos de hasta 50, en placas de cuatro pocillos que contenían 250  $\mu$ l de medio de fecundación (medio Tyrode's suplementado con 25 mM de bicarbonato sódico, 22 mM lactato sódico, 1 mM piruvato sódico, 6 mg/ml BSA y 10 mg/ml heparina (Calbiochem, Darmstadt, Alemania)). Los espermatozoides móviles fueron obtenidos mediante la centrifugación de semen de toro congelado/descongelado (ASEAVA, Llanera, Asturias, España) a través de un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (2,5 ml de Percoll al 45% (v/v) y 2,5 ml de Percoll al 90% (v/v)) durante 8 minutos a 700g y a temperatura ambiente (22-25 °C). El *pellet* obtenido del fondo de la fracción 90%, se lavó en medio Tyrode's tamponado con Hepes y se centrifugó a 100g durante 5 min. La concentración de los espermatozoides se evaluó en un hematocitómetro y se diluyeron en un volumen apropiado de medio de fecundación para conseguir una concentración final de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Una alícuota de 250  $\mu$ l de esta suspensión se añadió a cada uno de los pocillos de fecundación para obtener una concentración final de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Las placas se incubaron a 38,5 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad. La variación individual entre toros se redujo mezclando muestras de semen de los mismos dos toros en todos los experimentos.

Después de la incubación con los espermatozoides durante 22 h, los presuntos cigotos fueron transferidos a gotas de 25  $\mu$ l de medio de cultivo de fluido oviductal sintético (Syntetic Oviductal Fluid; SOF) (1 embrión /  $\mu$ litro) durante 7 u 8 días a 38,5 °C, en

un ambiente con un 5% CO<sub>2</sub> y un 5% de O<sub>2</sub> y máxima humedad. Las tasas de división se registraron a las 48 horas post-inseminación y el número de blastocistos obtenidos se evaluó a los 7 y 8 días después de la inseminación.

### **Clasificación de los blastocistos**

Después de asegurar la calidad de los embriones (Gomez et al., 2008), los blastocistos fueron clasificados de acuerdo al grado de expansión del blastocele en 3 grupos, cada uno de la siguiente manera: 1) blastocistos no expandidos: el volumen del blastocele es menor al de la mitad del volumen total del blastocisto; 2) blastocistos expandidos: el volumen del blastocele es más de la mitad del volumen total del blastocisto, y 3) blastocistos eclosionando o eclosionados: blastocistos con la ZP abierta o sin ZP.

### **Vitrificación y calentamiento de los blastocistos**

Los blastocistos fueron vitrificados utilizando el cryotop como soporte de vitrificación. El cryotop consiste en una película de polipropileno estrecha y delgada (0,4 mm de ancho, 20 mm de largo y 0,1 mm de grosor) unido a un mango de plástico duro. Para proteger el dispositivo de daños mecánicos durante el almacenamiento, se coloca un tubo de plástico para cubrirlo (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón). El medio de mantenimiento (MM) utilizado para formular la solución de vitrificación y de calentamiento consistía en medio TCM 199-Hepes con un 20% de FCS. Los blastocistos fueron transferidos a la solución de equilibrio (ES) compuesta por un 7,5% de etilenglicol (EG) y un 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) en MM durante 10 - 15 min. A continuación, los blastocistos fueron trasladados a la solución de vitrificación (VS) compuesta por un 15% de EG, 15% DMSO y 0,5 M de sacarosa disuelta en MM. Después de una incubación de 30-40 s, los blastocistos (hasta un máximo de 2) se cargaron en el Cryotop, se eliminó casi toda la solución sobrante hasta dejar solamente una capa delgada de medio que cubría el/los blastocisto/s y la muestra fue rápidamente sumergida en nitrógeno líquido. Posteriormente, se colocó la tapa de plástico. El proceso desde la inmersión

en VS hasta el nitrógeno líquido se completó en menos de un minuto.

Durante el proceso de calentamiento, se retiró el protector de plástico del Cryotop cuando todavía estaba sumergido en nitrógeno líquido. A continuación, el Cryotop se sumergió directamente en la solución de calentamiento compuesta por 1 M sacarosa disuelta en MM. Después de 1 min, los blastocistos se colocaron en la solución de dilución, que contenía 0,5 M de sacarosa disuelta en MM. Los blastocistos fueron incubados durante 3 min realizando un suave pipeteo para facilitar la difusión de los CPAs fuera del embrión. Posteriormente, los blastocistos fueron incubados en MM durante 5 minutos. Y, finalmente, se pasaron de nuevo a MM durante 1 minuto antes de su transferencia al medio de cultivo SOF a 38,5 °C, en una atmósfera con un 5% CO<sub>2</sub> y un 5% de O<sub>2</sub> y máxima humedad. La supervivencia de los blastocistos se evaluó como la capacidad de re-expansión de los blastocistos después de 3 horas de incubación en medio SOF.

### **Valoración de la fragmentación del DNA de los embriones**

Tras 3 horas de incubación en SOF, y una vez evaluada su supervivencia, los embriones fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la fijación, se lavaron por lo menos tres veces en PBS con 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP) y se permeabilizaron en 0,5% Triton X-100 durante 2 min. Los embriones fueron lavados tres veces en PBS / PVP y se incubaron en el cóctel de TUNEL (*in-situ cell death detection kit*; Roche Diagnostic Inc., Indianapolis, IN) a 37 °C durante 1 h en oscuridad. Se incluyeron muestras control positivas y negativas en cada ensayo. Los blastocistos expuestos a DNasa I durante 15 min a temperatura ambiente se utilizaron como controles positivos y los blastocistos no expuestos a la enzima TdT terminal fueron los controles negativos. Los embriones fueron lavados en PBS y finalmente se transfirieron a la solución de Hoechst 33342 (25 mg/ml) durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Por último, los blastocistos fueron montados en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina, se cubrieron con una gota de medio de montaje y un cubreobjetos y los bordes se sellaron con esmalte de

Tabla I. Porcentajes de supervivencia post-calentamiento de los blastocitos bovinos tras ser vitrificados en diferentes estadios de desarrollo (no expandidos, expandidos o eclosionados) y diferentes días de cultivo *in vitro* (Día 7 o Día 8 post-inseminación).

Día	Nº blastocitos vitrificados/calentados	Supervivencia, % (n)					
		n	No expandidos	n	Expandidos	n	Eclosionados
7	203	117	52.1 (61) ac	67	79.1 (53) bc	19	73.7 (14) bc
8	202	91	30.8 (28) ad	43	53.5 (23) bd	68	54.4 (37) bd

<sup>a,b</sup> Valores con diferentes letras dentro de una misma línea difieren significativamente, P<0.05.

<sup>c,d</sup> Valores con diferentes letras dentro de una misma columna difieren significativamente, P<0.05.

ñas. Las muestras se almacenaron a -20 °C en oscuridad hasta su análisis en el microscopio confocal. Las imágenes se capturaron con un microscopio Leica TCS-SP2 láser confocal de barrido (Leica Microsystems, Heidelberg). Las longitudes de onda de excitación de la pieza fueron 364 nm para la tinción de Hoechst y 488 nm para el FITC - TUNEL conjugado. Los núcleos fueron anotados ya sea como intactos (TUNEL (-), marca roja) o DNA fragmentados (TUNEL (+), marca verde) y contados. El índice apoptótico se calculó como la proporción de TUNEL (+) / número total de núcleos, y el índice de integridad del DNA se calculó como TUNEL (-) / número total de núcleos.

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el paquete de análisis estadístico Systems (SAS, V8). Se obtuvieron al menos 10 réplicas de los datos. Los recuentos de células de los blastocitos en los diferentes grupos experimentales fueron analizados mediante ANOVA (PROC GLM). Las comparaciones de las tasas de supervivencia de los blastocitos después del proceso de vitrificación/calentamiento entre los distintos grupos de blastocitos

se llevaron a cabo mediante el test de Chi cuadrado. Los datos de supervivencia se transformaron en porcentajes de frecuencia, mientras que el recuento de células de los blastocitos fue expresado como valor absoluto. El nivel de significación estadística se fijó en p<0,05.

### Resultados

Experimento 1: Porcentajes de supervivencia después de la vitrificación de los blastocitos según su estadio de desarrollo o permanencia en cultivo *in vitro*.

La tabla I muestra los resultados correspondientes a los porcentajes de supervivencia post-calentamiento de los blastocitos bovinos tras ser vitrificados en diferentes estadios de desarrollo o tras diferente duración del cultivo embrionario *in vitro*. Así, se observó un aumento significativo de la tasa de supervivencia cuando los blastocitos fueron vitrificados en estadio de blastocisto expandido (79,1% y 53,5%) o eclosionado (73,7% y 54,4%) en comparación con los blastocitos no expandidos (52,1% y 30,8%) (días 7 y 8 post-inseminación, respectivamente). No se observaron diferencias significativas

en los porcentajes de supervivencia entre los blastocitos vitrificados en el estadio embrionario expandido o eclosionado.

Cuando se analizó el efecto del tiempo de cultivo embrionario *in vitro*, las tasas de supervivencia fueron significativamente más altas en aquellos blastocitos obtenidos y vitrificados en día 7 del cultivo embrionario (52,1%, 79,1% y 73,7%) comparado con los blastocitos obtenidos en día 8 (30,8%, 53,5% y 54,4%).

Experimento 2: Índice de integridad del DNA de las células de los blastocitos vitrificados según su estadio de desarrollo o permanencia en cultivo *in vitro*.

El daño celular en blastocitos bovinos vitrificados se evaluó a las 3 horas post-calentamiento mediante la tinción de TUNEL. Se compararon las tasas de integridad del DNA entre los blastocitos del grupo control (no vitrificados) y los blastocitos vitrificados en estadio de blastocisto no expandido, expandido o eclosionado (tabla II).

Los resultados muestran una ligera disminución en el índice de integridad del DNA en respuesta al proceso

Tabla II. Índice de integridad del DNA de las células de los blastocitos vitrificados según su estadio de desarrollo o permanencia en cultivo *in vitro*.

	Día	Nº blastocitos fijados / teñidos	n	No expandidos % ± DE	n	Expandidos % ± DE	n	Eclosionados % ± DE
Control	8	10	4	94.31±2.12	3	97.78±4.10	3	97.36±6.13
Control	7	14	5	92.13±6.75	5	95.47±4.25	4	94.64±5.31
Vitrificados/calentados	8	2	19	90.69±9.92	17	91.93±5.71	16	91.96±4.39
Vitrificados/calentados	7	48	24	90.32±5.69	19	93.07±5.33	5	95.22±3.84

Índice de integridad del DNA: nº de blastómeros TUNEL negativo/ nº total de blastómeros. DE: desviación estándar

de vitrificación/calentamiento en comparación con el grupo de embriones no vitrificados (control), disminución que no fue significativa. No se observaron diferencias significativas entre los distintos estadios de desarrollo de los blastocistos, ni entre la duración del cultivo *in vitro*. La Figura 1 muestra imágenes de microscopía confocal donde se observan blastocistos teñidos con la tinción de TUNEL.

## DISCUSIÓN

La crioconservación de los embriones bovinos producidos *in vitro* (PIV) es un requisito previo para su uso a gran escala comercial. Las tasas de gestación obtenidas después de la transferencia de embriones bovinos PIV congelados son relativamente bajas, lo que supone un claro indicio de su menor calidad en comparación con aquellos embriones obtenidos *in vivo*. La crioconservación de embriones en la etapa de blastocisto permite una mejor selección de los embriones y sirve para aumentar al máximo el potencial de implantación de la posterior transferencia del embrión. El grado de desarrollo del blastocisto en el momento de la vitrificación puede ser un factor clave que influya en los resultados. En este estudio, se observó un aumento significativo de la tasa de supervivencia de aquellos blastocistos vitrificados en estadio de blastocisto expandido o eclosionado. Además, se observaron tasas similares en la integridad del DNA entre los blastocistos vitrificados y aquellos blastocistos frescos (no vitrificados). Entre los numerosos factores que afectan la supervivencia a la crioconservación, distintos estudios han descrito que tanto la edad, la etapa de desarrollo, la calidad del embrión o las interacciones entre estos factores son muy importantes durante la crioconservación de embriones bovinos PIV (Carvalho et al., 1996; Mahmoudzadeh et al., 1995; Pugh et al., 1998; Saha et al., 1996).

Varios estudios han descrito diferencias en las tasas de supervivencia o porcentajes de eclosión después de la crioconservación de blastocistos obtenidos tras diferentes tiempos de cultivo *in vitro*, haciendo hincapié

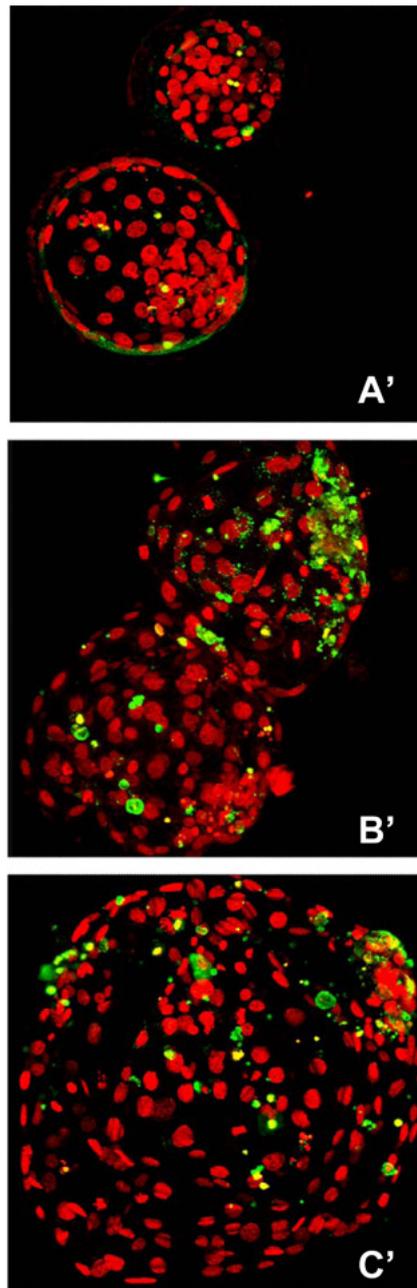


Figura 1. Blastocistos teñidos con la tinción de TUNEL para visualizar el DNA fragmentado después de un proceso de vitrificación/calentamiento en diferentes etapas de desarrollo: A': blastocisto no-expandido, B': blastocisto expandido y C': blastocisto eclosionado. Todos los blastómeros se teñen de rojo y los que muestran fragmentación del DNA muestran una coloración verde superpuesta. Los blastómeros individuales fueron clasificados como intactos (TUNEL -, mancha roja) o con DNA fragmentado (TUNEL +, mancha verde) y contados.

en que la duración del cultivo de embriones afecta a la criotolerancia de los blastocistos producidos (Cseh et al., 1996; Gustafsson et al., 2001; Hasler et al., 1995; Hasler et al., 1997; Havlicek et al., 2009). Gustafsson y colaboradores (2001) observaron que los embriones obtenidos después de 7 días de cultivo *in vitro* mostraban 3 veces más posibilidades de sobrevivir a la congelación y descongelación

que aquellos embriones congelados en los días 8-9 de cultivo embrionario *in vitro*, independientemente de su fase de desarrollo. En un estudio más reciente, Havlicek y col. (2009) describieron resultados similares en embriones bovinos crioconservados mediante técnicas de congelación lenta. Observaciones similares se obtuvieron cuando la vitrificación fue utilizada como método de crioconservación de embriones bovinos (Mahmoudzadeh et al., 1995; Ohboshi et al., 1997; Saha and Suzuki, 1997). Nuestros resultados están de acuerdo con estas observaciones, ya que las tasas de supervivencia significativamente más altas se registraron en aquellos blastocistos obtenidos y vitrificados en día 7 de cultivo *in vitro*. En contraste, Dinnyés y colaboradores (1999) observaron que la supervivencia de los blastocistos vitrificados en día 7 o en día 8 era similar.

En nuestros experimentos, la supervivencia está relacionada con una fase embrionaria más avanzada en un día determinado. Las razones de las altas tasas de supervivencia de los embriones en sus etapas más avanzadas aún quedan por aclarar. En nuestro estudio se observó que cuando el volumen del blastocele era mayor, la deshidratación de éste era más pronunciada y constante. Estos blastocistos presentaban una ZP más delgada y posiblemente más permeable que la de aquellos blastocistos en fases tempranas (no expandidos). En contraste con nuestros resultados, algunos estudios han descrito que los blastocistos expandidos muestran tasas de supervivencia inferiores después de los procesos de vitrificación en comparación con los blastocistos no expandidos (Cho et al., 2002; Vanderzwalmen et al., 2002). En este tipo de blastocistos, que presenta un blastocele mayor que el de los no expandidos, se pueden formar cristales de hielo durante la congelación, provocando daños mecánicos. Considerando este factor, se ha postulado que la reducción artificial del contenido líquido del blastocele podría mejorar la eficiencia de la vitrificación (Hiraoka et al., 2004a; Son et al., 2003; Vanderzwalmen et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que

la vitrificación de los blastocistos expandidos mejoró los resultados del calentamiento sin la necesidad de la aspiración del blastocele.

Son pocos los trabajos relacionados con la vitrificación de blastocistos en estadio de eclosión o completamente eclosionados (Galan et al., 2003; Hiraoka et al., 2004b; Zech et al., 2005). Las técnicas de reproducción asistida deben considerar la posibilidad de crioconservar blastocistos con una ZP abierta o completamente eclosionados como un reto importante, especialmente cuando se trata de embriones procedentes de cultivos embrionarios prolongados o sometidos a un diagnóstico genético preimplantacional. Los buenos resultados de supervivencia a la descongelación obtenidos en este estudio tras la vitrificación de embriones eclosionados demuestran que la presencia de una ZP intacta no es necesaria para que la vitrificación tenga éxito, y son similares a los obtenidos en estudios donde se realizó una biopsia embrionaria previa al proceso de congelación lenta (Gustafsson et al., 1994; Schmidt et al., 1992) o de vitrificación (Agca et al., 1995).

Una vez evaluada la supervivencia de los blastocistos bovinos, procedimos a evaluar su integridad mediante la determinación del índice de apoptosis. El índice de apoptosis de un blastocisto es un factor importante que ha sido correlacionado negativamente con el potencial de desarrollo embrionario (Makarevich and Markkula, 2002; Spanos et al., 2002). Después de la crioconservación, los blastocistos bovinos inician una reorganización celular, particularmente a nivel del citoesqueleto, el cual puede estar parcialmente despolimerizado debido a la presencia de los CPAs o al proceso de crioconservación (Dobrinsky, 1996). Por otra parte, las membranas celulares también pueden sufrir diferentes lesiones durante el proceso de crioconservación (Acker and McGann, 2001; Wolfe and Bryant, 1999), cuya magnitud puede influenciar la supervivencia embrionaria. A pesar de que nuestros resultados no muestran diferencias en los niveles de apoptosis entre embriones frescos y vitrificados, se debe tener en cuenta que se analizó la fragmentación del DNA 3 horas después del calentamiento, lo que nos lleva a hipotetizar que o bien el daño

provocado por el proceso de vitrificación a nivel de DNA fue transicional y que las células pudieron restablecer su integridad durante el periodo post-calentamiento, o que dicho periodo no fue suficiente para cuantificar la cantidad de daño producido por el proceso de vitrificación/calentamiento. Utilizando diferentes criosoportes, Park y colaboradores (2006) sí observaron un índice apoptótico significativamente superior cuando se vitrificaron blastocistos bovinos PIV en día 7 en pajuelas de 0,25ml (11,9%) o en pajuelas minimum volume cooling (MVC) (11,0%), comparado con los embriones no vitrificados (3,0%).

En conclusión, el tiempo de cultivo embrionario in vitro para obtener los blastocistos, así como el estadio de desarrollo de éstos, son factores importantes a considerar durante el proceso de vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro. Más específicamente, nuestros resultados indican que la vitrificación utilizando el cryotop como soporte parece ser particularmente útil para la criopreservación de blastocistos bovinos con un alto grado de expansión (blastocistos expandidos o eclosionados), y, principalmente, en aquellos blastocistos vitrificados en día 7 post-inseminación.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por Ministerio Español de Educación y Ciencia (número de proyecto: AGL2007-60227/GAN) y de la Universidad Autónoma de Barcelona (número de la donación: EME2004-25).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acker JP, McGann LE. Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice. *Cryo Letters* 2001; 22(4):241-254.
- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Schaefer DM, Rutledge JJ. Post-thaw survival and pregnancy rates of biopsied, sexed and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 1995; 43:153.
- Behr B, Gebhardt J, Lyon J, Milki AA. Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program. *Fertil Steril* 2002; 77(4):697-699.
- Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. Piglets born after

vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000; 41(2):116-124.

Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y, Mapletoft RJ. Survival rates and sex ratio of bovine IVE embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology* 1996; 45(2):489-498.

Cseh S, Wang G, Corselli J, Nehlsen-Cannarella SL, Bailey LL, Szalay AA. Rapid freezing of mouse embryos in ethylene glycol at different preimplantation stages. *Acta Vet Hung* 1996; 44(4):457-465.

Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci* 2002; 73(3-4):151-158.

Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1999; 53(3):318-324.

Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996; 45(1):17-26.

Galan A, Escriba MJ, Gamiz P, Mercader A, Rubio C, Crespo J. High survival rate of human blastocysts after preimplantation genetic diagnosis and vitrification. *Human Reproduction* 2003; 18(Suppl. 1):141.

Gomez E, Rodriguez A, Munoz M, Caamano JN, Hidalgo CO, Moran E, et al. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 2008; 69(8):1013-1021.

Gustafsson H, Jaakma U, Shamsuddin M. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta Vet Scand* 1994; 35(3):217-222.

Gustafsson H, Larsson B, Shamsuddin M, Jaakma U, Emanuelson U. Factors affecting the survival of frozen thawed bovine in vitro produced blastocysts. *Asian-Aust J Anim Sci* 2001; 14(1):7-12.

Hasler JF, Henderson WP, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, et al. Trimmer, Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995; 43:141-152.

Hasler JF, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 1997; 48(4):563-579.

Havlicek V, Kuzmany A, Cseh S, Brem G, Besenfelder U. The Effect of Long-term In Vivo Culture in Bovine Oviduct and Uterus on the Development and Cryo-tolerance of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Reprod Domest Anim* 2009.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004a; 19(12):2884-2888.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Case report: successful pregnancy after vitrification of a human blastocyst that had completely escaped from the zona pellucida on day 6. *Hum Reprod* 2004b; 19(4):988-990.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Vitrification of human hatched blastocysts: a report of 4 cases. *J Reprod Med* 2007; 52(5):413-415.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J Reprod Fertil* 1995; 103(1):33-39.

Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod* 2002; 66(2):386-392.

Menezo YJ. Blastocyst freezing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115 Suppl 1:S12-15.

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* 2008; 57(2):137-141.

Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim Reprod Sci* 1997; 48(1):27-36.

Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 2006; 14(2):125-131.

Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Anim Reprod Sci* 2008; 106(3-4):322-332.

Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, et al. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* 2005; 63(8):2254-2268.

Pugh PA, Ankersmit AE, McGowan LT, Tervit HR. Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology* 1998; 50(3):495-506.

Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG, Alberio RH. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2010; 118(1):19-24.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003; 68(1):236-243.

Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology* 2001; 56(1):1-16.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61(2):234-248.

Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology* 1996; 46(2):331-343.

Saha S, Suzuki T. Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9(7):741-746.

Schmidt M, Avery B, Smith SD, Purwantara B, Greve T. The freezability of biopsied bovine embryos. *Theriogenology* 1992; 38(4):615-621.

Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 1999; 38(2):95-105.

Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod* 2003; 18(1):137-139.

Spanos S, Rice S, Karagiannis P, Taylor D, Becker DL, Winston RM, et al. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction* 2002; 124(3):353-363.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(1):53-58.

Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006; 65(1):236-244.

Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum Reprod* 2002; 17(3):744-751.

Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology* 1999; 39(2):103-129.

Zech NH, Lejeune B, Zech H, Vanderzwalmen P. Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(3):355-361.



Tu compañero en la clínica FIV  
te ofrece el laboratorio al completo



**SANYO**



**IVFtech**



**RI**



**MB**  
molecular biometrics

**SAGE**



**BioCare Europe**

tel +39 0644240341

fax +39 0644240358

Número Verde 900993936

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

**BioCare Europe,**  
**las mejores marcas en 24/48 horas**

# IMPACTO DE LA OLIGOZOOSPERMIA EN EL PATRÓN DE VACUOLIZACIÓN ESPERMÁTICA EN MUESTRAS EN FRESCO

## IMPACT OF OLIGOSPERMIA ON VACUOLIZATION PATTERN FROM FRESH SPERM SAMPLES

Laura Prats, María Rodríguez Agüera, Olga Cairó, Sergio Rovira, Felipe del Río, Arturo Brassesco, Mario Brassesco  
Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH), Clínica Corachán · Plaza Eguilaz, 14. 08017 Barcelona  
e-mail: laboratorio@cirh.es

Fecha recepción: 27 septiembre 2010 · Fecha aceptación: 26 octubre 2010

### RESUMEN

**Objetivo:** Valorar la repercusión de la concentración en una muestra seminal en el patrón de vacuolización de los espermatozoides.

**Material y métodos:** Realizando un test de magnificación, se comparó el patrón de vacuolización de 70 muestras oligozoospermicas (OZ) con un grupo control de 70 muestras normozoospermicas (NZ). Se clasificaron 100 espermatozoides de cada muestra en 4 grados, en función de la presencia y tipología de las vacuolas: grado I (ausencia de vacuolas), grado II (máximo 2 vacuolas pequeñas), grado III (1 vacuola grande o más de 2 pequeñas), grado IV (vacuolas grandes y/u otras anomalías).

**Resultados:** Se compararon los resultados de las medias aritméticas para cada grado de vacuolización. Los resultados obtenidos demuestran un descenso de espermatozoides de grados I (NZ: 3,66% vs OZ: 2,01) y II (NZ: 24,49% vs OZ: 14,14%) y un aumento de los de grado III (NZ: 43,43% vs 48,74%) y IV (NZ: 28,57% vs 35,08%) en las muestras oligozoospermicas. Realizando un análisis de subgrupos de todas las muestras evaluadas en función de su concentración espermática, el descenso de buenos espermatozoides (grado I y II) es más acusado a partir de concentraciones  $\leq 10$  mill/ml.

**Discusión:** Los resultados evidencian la relación que existe entre la presencia de espermatozoides de buena calidad y la concentración espermática. En una muestra oligozoospermica la probabilidad de encontrar buenos espermatozoides es menor. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):35-38.

**Palabras clave:** Alta magnificación, oligozoospermia, vacuolización, concentración espermática.

### SUMMARY

**Aim:** To assess the repercussion of sperm concentration in the spermatozoa vacuolization pattern.

**Materials and Methods:** The vacuolization pattern of 70 oligospermic samples have been compared to 70 normospermic control samples by high magnification test. One hundred spermatozoa from each sample were classified according to the presence and type of vacuole: grade I (normal form and no vacuoles), grade II (normal form and  $\leq 2$  small vacuoles), grade III (normal form,  $> 2$  small vacuoles or at least one large vacuole), and grade IV (large vacuole and abnormal head shapes or other abnormalities).

**Results:** Arithmetic means from each grade of vacuolization were calculated. The results from the oligospermic samples showed a decrease from grade I (NZ: 3.66% vs OZ: 2.01) and II spermatozoa (NZ: 24.49% vs OZ: 14.14%) and an increase in those from grade III (NZ: 43.43% vs 48.74%) and IV (NZ: 28.57% vs 35.08%). Making a subgroup analysis of all the assessed samples, good spermatozoa decrease (grade I and II) is more outstanding from  $\leq 10$  mill/ml concentration according to its sperm concentration.

**Discussion:** The results prove the correlation between good quality spermatozoa presence and sperm concentration. The probability of finding good spermatozoa is lower in an oligospermic sample. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):35-38.

**Key words:** high magnification test, oligospermia, vacuolization, sperm concentration.

### INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco tiempo la única técnica disponible en el laboratorio de fecundación in vitro para casos con factor masculino severo era la microinyección espermática convencional conocida como ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*, Palermo et al, 1992). La ICSI permite la selección individual de los mejores espermatozoides presentes en una muestra en cuanto a motilidad y morfología. Esta selección del espermatozoide a 200x y 400x

depende del buen criterio del biólogo, existiendo un cierto riesgo de seleccionar espermatozoides con algún tipo de anomalía morfológica y/o genética que pudiera afectar a los embriones.

Existen diversos factores asociados a la oligozoospermia (OZ), como la edad, distintas disfunciones hormonales, consumo de alcohol, factores genéticos e incluso idiopáticos, que podrían constituir probables mecanismos desencadenantes de una desregularización de la homeostasis testicular.

Diferentes estudios realizados hasta la fecha verifican que la OZ está directamente relacionada con un aumento de anomalías genéticas en espermatozoides. En 2003, Schmid, observó que en pacientes con OZ existía un incremento de aneuploidías y diploidías en los cromosomas sexuales de la línea germinal, así como niveles altos de daño en la cromatina espermática y un aumento de roturas en las cadenas de DNA (Schmid et al., 2003). Estos resultados indican que la infertilidad de estos pacientes oligozoospermicos no

se debe únicamente a la concentración espermática. Estudios posteriores corroboran la disminución de la calidad de la cromatina y DNA y el aumento de anomalías genéticas en espermatozoides de muestras OZ (Pang et al, 1999; Vegetti, 2000; Rubio, 2001; Calogero, 2001). Todo esto se traduce en peores tasas de implantación y embarazo.

Así, la utilización de la ICSI como única solución para la infertilidad de pacientes oligozoospermicos genera dudas sobre si la selección del espermatozoide es la correcta.

Desde que Bartoov describiera en 2003 sus resultados con la valoración morfológica de los espermatozoides a grandes aumentos, muchos autores consideran esta técnica como el complemento ideal en el estudio del factor masculino (Bartoov et al., 2003). Esta técnica permite valorar ultraestructuras de los espermatozoides en tiempo real, antes imperceptibles mediante una ICSI convencional. Principalmente se valora la correcta morfología del espermatozoide y la presencia o ausencia de vacuolas nucleares. La presencia de vacuolas nucleares disminuye el éxito de los tratamientos de reproducción asistida (TRA) y aumenta sensiblemente las tasas de aborto temprano (Berkovitz, 2005, 2006). Vanderzwalmen también describe un efecto deletéreo tardío de la presencia vacuolar en el desarrollo de los embriones y propone una clasificación dependiendo del número y tamaño vacuolar en el núcleo espermático: grado I (ausencia de vacuolas y morfología normal), grado II (máximo 2 vacuolas pequeñas y morfología normal), grado III (1 vacuola grande o más de 2 pequeñas y morfología normal), grado IV (vacuolas grandes y/u otras anomalías) (Vanderzwalmen et al., 2008). Observa que la fecundación de ovocitos con espermatozoides de grados III y IV afecta negativamente al desarrollo embrionario y la obtención de blastocistos de buena calidad.

Varios estudios posteriores (Franco et al, 2008; Junca et al, 2009) relacionan la presencia de vacuolas en la cabeza del espermatozoide con un aumento de la fragmentación y desnaturalización del DNA.

Garolla et al (2008) realizó un estudio a partir de muestras de pacientes con oligozoospermia severa por obstrucción

parcial de vías seminales y pacientes con OZ severa por hipoespermatogénesis. Utilizando como grupo control muestras NZ, evaluó varios parámetros seminales: actividad de la membrana mitocondrial, fragmentación de DNA y aneuploidías. Los dos grupos de pacientes OZ, especialmente los pacientes con hipoespermatogénesis presentaron peor funcionalidad de la membrana mitocondrial y mayores tasas de fragmentación del DNA y de aneuploidías, que los pacientes con muestras NZ. Utilizaron la alta magnificación para seleccionar espermatozoides de pacientes con daño testicular y compararon espermatozoides morfológicamente normales con vacuolas y sin vacuolas. Los espermatozoides morfológicamente normales sin vacuolas presentaban valores significativamente mejores en cuanto a todos los parámetros estudiados.

Sabiendo que los espermatozoides de muestras OZ presentan mayores tasas de anomalías genéticas y daño de DNA y que el daño en el DNA se relaciona con la presencia de vacuolas nucleares, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar si existe una correlación entre la concentración espermática y los patrones de vacuolización en este tipo de muestras.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio prospectivo se analizaron 140 muestras de semen mediante test de magnificación: 70 muestras oligozoospermicas como grupo de estudio

y 70 muestras normozoospermicas como grupo control. A todos los pacientes se les realizaron, con anterioridad, al menos dos seminogramas para evaluar su concentración espermática. El diagnóstico se realizó siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992) para la clasificación de muestras oligozoospermicas (<20 mill/ml) y normozoospermicas (≥20 mill/ml).

Una vez hecho el diagnóstico, cada paciente entregó una nueva muestra de semen de la que se separó una alícuota de 5 µl para realizar el test de magnificación.

Para el análisis de las muestras se utilizó un microscopio invertido AM6000 equipado con óptica de contraste interdifereencial (DIC) desarrollado por Leica. El microscopio tiene 2 objetivos de inmersión, de 20 y de 100 aumentos. Con el objetivo de 100x obtenemos una imagen de 1000 aumentos ópticos que, si añadimos una lente suplementaria de 1,6x, nos permite conseguir hasta 1600 aumentos ópticos.

El microscopio está equipado con un VarioZoom digital con el que podemos obtener imágenes nítidas de hasta 16000 aumentos digitales.

Para la observación de los espermatozoides con DIC se utilizaron placas con fondo de vidrio (Willcodish@HBST-5040 Willco Wells, Holanda), donde se dispuso 1 µl de la muestra capacitada en una gota de



Fig. 1. Patrón de vacuolización. 1, ausencia de vacuolas y morfología normal; 2, máximo 2 vacuolas pequeñas y morfología normal; 3, 1 vacuola grande o más de 2 pequeñas y morfología normal; 4, vacuolas grandes y/u otras anomalías.

3  $\mu$ l de polivinilpirrolidona (PVP), todo ello recubierto con aceite mineral. La observación para este estudio se realizó con el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

Una vez visualizados, se clasificaron 100 espermatozoides de cada muestra según el modelo propuesto por Vanderzwalmen (2008), descrito anteriormente, en función de su patrón de vacuolización (ver fig. 1).

## RESULTADOS

Para valorar los resultados se calcularon las medias aritméticas de los diferentes grados de vacuolización de las muestras oligozoospermicas (OZ) y normozoospermicas (NZ), obteniendo para las muestras NZ 3,66% de espermatozoides de grado I, 24,49% de grado II, 43,43% de grado III y 28,57% de grado IV. Para las muestras OZ se obtuvieron 2,01% de grado I, 14,14% de grado II, 48,74% de grado III y 35,08% de grado IV. Según se muestra en la Tabla I, se observa un menor porcentaje de los espermatozoides de grado I y II y un mayor porcentaje de los de grado III y IV en las muestras oligozoospermicas respecto a las normozoospermicas.

Evaluando con más detalle los resultados, se realizó un análisis de subgrupos en función de la concentración espermática de cada muestra, considerando los siguientes subgrupos: 1-9 mill/ml, 10-19 mill/ml, 20-49 mill/ml, 50-99 mill/ml y  $\geq 100$  mill/ml. Los resultados de este análisis quedan reflejados en la figura 2 y evidencian que, a medida que disminuye la concentración espermática, las muestras presentan menos espermatozoides de grado I y II y más de grado III y IV.

La tendencia demostrada para el análisis primario se hizo aún más evidente al calcular las medias de espermatozoides considerados de buena calidad (grados I + II) y de mala calidad (grados III + IV) en función de la concentración espermática (Tabla II), pues encontramos que, para muestras con concentraciones iguales o superiores a 100 mill/ml, obtuvimos 35,90% espermatozoides de buena calidad y 64,10% de mala calidad, mientras que en muestras con concentraciones espermáticas de 1-10 mill/ml obtuvimos 12,67% espermatozoides de buena calidad y 87,33% de mala calidad.

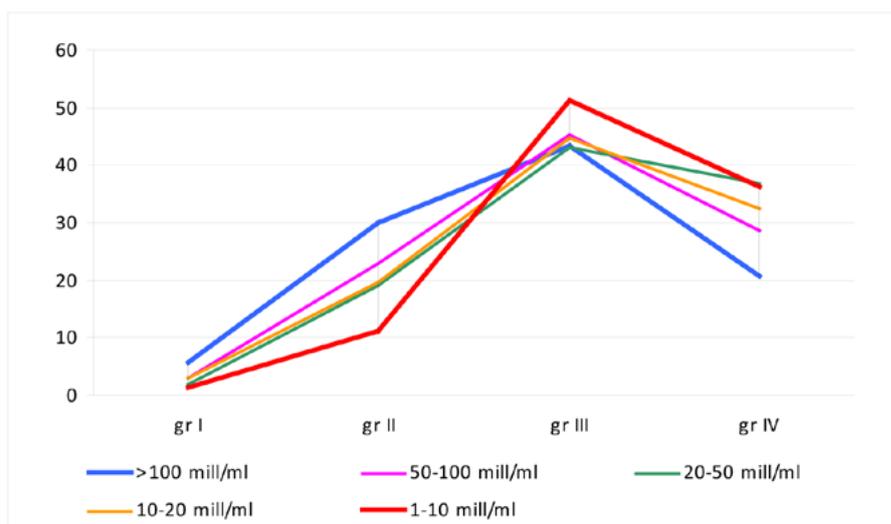


Figura 2. Patrón de vacuolización en función de la concentración espermática.

## DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio todas las muestras OZ presentan más espermatozoides de mala calidad (grado III y IV) que las muestras NZ del grupo control.

Con el análisis de subgrupos observamos un claro patrón de vacuolización en función de la concentración espermática. A medida que disminuye la concentración espermática disminuye la presencia de espermatozoides de buena calidad (grado I y II) y aumenta la presencia de espermatozoides de mala calidad (grado III y IV).

A partir de una concentración espermática inferior a 10 mill/ml, la disminución de

espermatozoides de buena calidad se hace aún más evidente. En concentraciones de 10-20 mill/ml encontramos 22,79% espermatozoides de buena calidad y con una concentración inferior a 10 mill/ml obtenemos aproximadamente la mitad (12,67%) de espermatozoides de buena calidad.

Al recibir una muestra de semen únicamente podíamos determinar parámetros básicos de un seminograma para realizar un diagnóstico. Actualmente disponemos de novedosas técnicas que nos pueden dar mucha información sobre el estado de los espermatozoides.

Por ejemplo, la aparición de un test de fácil aplicación para la valoración de la

**Tabla I. Patrones de vacuolización (medias, %)**

	gr I	gr II	gr III	gr IV
<b>Oligozoospermia</b>	2,01	14,14	48,74	35,08
		16,15		83,82
<b>Normozoospermia</b>	3,66	24,49	43,43	28,57
		28,15		72,00

**Tabla II. Patrones de vacuolización. Análisis estratificado según concentración espermática**

Concentración (mill/ml)	gr I-gr II	gr III-gr IV
<b><math>\geq 100</math></b>	35,90	64,10
<b>50-100</b>	25,81	73,76
<b>20-50</b>	21,06	79,85
<b>10-20</b>	22,79	77,18
<b>1-10</b>	12,67	87,33

fragmentación de DNA espermático, facilita su incorporación a la rutina del laboratorio de andrología para determinadas muestras.

Por otro lado, el test de alta magnificación nos permite evaluar la presencia de orgánulos y alteraciones morfológicas del espermatozoide, antes imperceptibles en una ICSI convencional. Actualmente, ya está bien descrita la relación entre la fragmentación del DNA y la presencia de vacuolas nucleares en los espermatozoides.

En nuestro laboratorio, el microscopio de alta magnificación AM6000 nos facilita la posibilidad de realizar IMSI en pacientes que lo requieren por historia clínica, mejorando la probabilidad de embarazo. En el laboratorio de andrología proporciona la posibilidad de combinar los test de magnificación y fragmentación para evaluar la calidad seminal. Un estudio realizado en el CIRH, utiliza las dos técnicas para comprobar si el tratamiento multivitamínico con antioxidantes durante un mes produce una mejora tanto en la fragmentación del DNA como en la calidad espermática de las muestras. En este estudio, se incluyeron 33 pacientes y se evaluó una muestra antes y después del tratamiento, observándose una disminución significativa de la fragmentación del DNA y de la vacuolización nuclear (artículo en preparación).

Sin embargo, los test de magnificación resultan también una herramienta útil para el estudio del semen antes de empezar los tratamientos de TRA.

Con un test de magnificación *in vivo* podemos valorar el estado de los espermatozoides y podríamos llegar a dirigir a los pacientes hacia el TRA más apropiado para ellos.

Wittemer et al. (2006) sugieren esta posibilidad después de realizar un test de magnificación a 55 parejas previo al TRA. Realizó tanto FIV como ICSI a todas las parejas y concluye que en las muestras con un  $\geq 8\%$  de formas normales, los resultados de fecundación son similares en la FIV e ICSI. En las muestras con  $< 8\%$  de formas normales se obtienen mejores tasas de fecundación con ICSI. La tasa de implantación es superior en las muestras con  $\geq 8\%$  de espermatozoides normales. De esta manera, según el resultado del test de magnificación se podría dirigir a los pacientes a FIV o ICSI.

Observando nuestros resultados y valorando la utilidad que nos puede ofrecer esta técnica podríamos recomendar realizar un test de magnificación de manera rutinaria en muestras con menos de 10 mill/ml, debido a la alta probabilidad de que estas muestras contengan un alto porcentaje de espermatozoides de mala calidad. De esta manera, con un simple test de magnificación se podría recomendar a estos pacientes la técnica de TRA más adecuada (FIV/ICSI o IMSI). En pacientes con una concentración espermática menor a 1 mill/ml prácticamente no existen espermatozoides para seleccionar y se debería realizar una ICSI.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración en la obtención de resultados al Laboratorio de Andrología del Centro de Infertilidad y Reproducción Humana (CIRH, Clínica Corachán), especialmente a Gemma López y al doctor Juan Manuel Nardín (Sanatorio de la Mujer, Rosario, Argentina) por su colaboración en la elaboración y revisión de este estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, et al. Pregnancy Rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003; 80:1413-1419.

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; 21:1787-1790.

Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod*. 2005; 20:185-190.

Calogero A, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Burrello N, Palermo I, et al. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. *Hum Reprod* 2001; 6:1433-1439.

Garolla A, Fortini D, Meneazzo M, de Toni L, Nicoletti V, Selice V et al. High power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:610-616

Franco Jr JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JBA, Vagnini L. Significance of large vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2008; 17:42-45.

Junca AM, Cohen-Bacrie P, Belloc S, Dumont M, Ménéz Y. Teratozoospermia at the time of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI). *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2009; 37: 552-557.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17-18.

Pang M.G, Hoegerman S.F, Cuticchia A.J, Moon SY, Doncel GF, Acosta AA, et al. Detección de aneuploidía for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14:1266-1273.

Rubio C, Gil-Salom M, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Mínguez Y et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 6:2084-92.

Schimid TE, Kamischke AK, Bollwein H, Nieschlag E and Brinkworth MH. Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and comet assay *Hum Reprod* 2003; 18:1474-1480.

Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles *Reprod Biomed Online* 2008; 17:617-627.

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

Wittemer C, Pujol A, Boughali H, Viville S. The impact of high-magnification evaluation of sperm on ART outcome *Hum Reprod* 2006; 22 (Suppl1) i50-i60.

World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction (3rd edition). 1992. Cambridge University Press: Cambridge, UK.



# DGP para todos los cromosomas

Con esta nueva técnica se **detectan** más **anomalías** y se **mejoran** las posibilidades de **embarazo**.

sin coste  
añadido

>100 biólogos nacionales  
e internacionales ya se  
han formado con nosotros

Consulta nuestros cursos prácticos  
en técnicas de micromanipulación en:

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



centro de medicina  
embrionaria

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

Madrid y Barcelona - España



Reproductive  
Genetic  
Institute

Chicago - USA

[pgd@pgdcem.com](mailto:pgd@pgdcem.com)

El Debate del presente número es “Vitrificación de oocitos para retrasar la maternidad”. Esta posibilidad que tienen actualmente las mujeres ha

sido motivo de controversia. En el próximo número de junio, el tema de debate será “DPI en enfermedades de aparición tardía”. Os recordamos

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

## VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS PARA RETRASAR LA MATERNIDAD

Teresa Ganzabal  
Clínica Quirón Bilbao

Es llamativo el retraso de la maternidad experimentado en la segunda mitad del siglo XX. Cuando estudiaba ginecología, una primípara añosa era aquella de 30 años. Actualmente una mujer que apueste por una carrera profesional no se lo puede plantear antes.

Como mujer y profesional siempre he considerado que la naturaleza era machista en este tema, pues, mientras los compañeros de profesión no tenían prisa por completar su proyecto reproductivo, las compañeras veíamos con horror que el paso de los años corría en nuestra contra y teníamos que tomar decisiones a veces equivocadas, o cuanto menos de las que nos arrepentíamos años más tarde.

La vitrificación de ovocitos hoy por hoy es una alternativa segura que nos permite tomar una decisión tan importante en nuestras vidas de una forma más relajada, y de la que nos podremos igualmente arrepentir al cabo de los años, pero al menos tenemos esta alternativa que nos permite la fantasía de sentirnos un poco más iguales a nuestros compañeros.

A los profesionales de la reproducción, la técnica de vitrificación de ovocitos con la que tan buenos resultados estamos obteniendo nos permite también ir completando un banco de ovocitos de donantes de diferentes características y grupos sanguíneos, con la que también nos acercamos a la filosofía del banco de semen y nos hace sentir más iguales a ellos.

Ni que decir de las pacientes oncológicas que tantos quebraderos de cabeza han traído a algunos de nuestros compañeros, que han dedicado una parte muy importante de su carrera profesional a preservar la fertilidad de estas pacientes, y hoy, gracias a las buenas perspectivas que nos ofrece esta técnica, también nos acerca al varón que con tanta facilidad podía preservar la suya.

Por todo ello me parece que la técnica de vitrificación de ovocitos nos permite a las mujeres un acercamiento muy importante a la igualdad entre sexos por la que generaciones de mujeres, empezando por las sufragistas del XIX, vienen luchando.

## PRESERVACIÓN SOCIAL, ¿UNA REALIDAD O FICCIÓN?

Sílvia González Juanmartí  
IVI Barcelona

En la sociedad actual existe un retraso de la maternidad debido a un importante factor social. La incorporación de la mujer a mejores puestos de trabajo, la presión social y la competitividad en el puesto de trabajo hace que la mujer tenga que posponer su maternidad y muchas veces planificar en su vida el mejor momento para buscar una gestación.

Ha habido un cambio en los últimos años en las características de las mujeres sin pareja que querían tener descendencia que consultan en centros de reproducción. Realizábamos ciclos de reproducción asistida de forma inmediata en el momento que venían un poco presionadas por la edad y por el reloj biológico, ya que era la mejor opción que les podíamos ofrecer.

Dado a los avances de la ciencia y la incorporación de técnicas de vitrificación, la situación está cambiando y podemos informar a las pacientes de estas posibilidades de tratamiento.

El perfil de la mayoría de las pacientes que demandan preservar su fertilidad son mujeres a partir de los 37 años con un nivel socioeconómico elevado y estudios superiores. Son mujeres con éxito profesional que no han encontrado pareja o bien mujeres que sí que tienen pareja y que no tienen previsto una maternidad en un periodo inminente. Todas ellas son conscientes del envejecimiento fisiológico de la reserva ovárica y por eso están informadas de las posibles opciones que tienen para posponer su maternidad.

¿Qué les podemos ofrecer a estas pacientes? En primer lugar, les informamos que este tratamiento no les garantiza la fertilidad, pero les puede ayudar en el futuro para intentar tener hijos biológicos. Lo que pudiera pasar en el momento que decidieran gestar, es que les sería muy difícil por la edad y lo que ello conlleva.

Les explicamos que se someterán a un proceso de estimulación ovárica y posteriormente al proceso de vitrificación, con una descongelación futura que puede estar influenciada en función de la edad de la paciente.

Una vez explicado el proceso detalladamente, iniciamos el tratamiento y criopreservamos sus óvulos hasta que ellas lo deseen.

¿Es lícito este procedimiento según mi punto de vista? En mi opinión y como mujer ginecóloga estoy totalmente de acuerdo. Entiendo a mis pacientes que me solicitan este tratamiento, ya que ellas son las que tienen la potestad de decidir sobre su vida y sobre su fertilidad. Al fin y al cabo, si planifican su maternidad puede ser beneficioso para este hijo en muchos aspectos.

La mayoría de mujeres planificamos nuestra maternidad en función de nuestras necesidades sociales, laborales, económicas, para garantizar

al máximo el cuidado de nuestros futuros hijos. Utilizamos métodos anticonceptivos o mecanismos de barrera para que no suceda un embarazo en un momento no deseado por nosotras o en el seno de una pareja. Por tanto, lo mismo que todas las mujeres podemos decidir de forma autónoma cuándo creemos que es el mejor momento para buscar una gestación, las pacientes que vienen para preservar su fertilidad también tienen derecho a decidir sobre su maternidad. A estas mujeres que están en edades límite, la opción que les podemos ofrecer es la vitrificación de

sus óvulos para que consigan, o tengan más probabilidad de conseguir, el deseo que la mayoría de mujeres tenemos en algún momento de nuestra vida.

Afortunadamente, con los avances en el campo de la reproducción es posible ofrecer a nuestras pacientes técnicas de vitrificación de óvulos. No sólo en el ámbito de la preservación social, sino también en pacientes oncológicas previo a la quimioterapia y en alguna ocasión en el de la práctica clínica diaria en un centro de reproducción.

## PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD POR CAUSAS SOCIALES, ¿POR QUÉ NO?

Nuria Alcañiz, Raquel Bonet, Montse Boada  
USP Institut Universitari Dexeus. Barcelona

El convenio para la Protección de los Derechos Humanos y de las Libertades Fundamentales contempla el derecho de cualquier mujer u hombre a partir de la edad núbil a formar una familia. De hecho, la libertad individual para decidir con quién y cuándo tener hijos es ampliamente aceptada en la sociedad moderna, siendo el control de la natalidad una práctica habitual. Desde su juventud, la mujer actual utiliza métodos anticonceptivos con el fin de retrasar el momento de la maternidad, sin que por ello sea cuestionada. Así pues, respetando el principio de autonomía, cada persona debería poder decidir cuándo quiere reproducirse.

De todos es sabido que en la sociedad occidental existe un retraso voluntario de la maternidad, debido a que un importante porcentaje de mujeres antepone la consecución de un estatus profesional, económico o social, a la procreación. Como consecuencia de ello, muchas mujeres sufren a la larga problemas de fertilidad debidos a los efectos negativos de la edad y se ven obligadas a recurrir a la reproducción asistida, teniendo incluso que recibir en algunos casos ovocitos de donante.

La posibilidad de ofrecer previamente a estas mujeres la opción de preservar

sus ovocitos en una edad aún temprana permite que, cuando quieran intentar una gestación, puedan hacerlo con sus propios ovocitos. La práctica de un ciclo de FIV con ovocitos propios criopreservados en una edad más joven les proporcionará mayor probabilidad de embarazo, a la vez que les posibilita perpetuar su linaje genético.

Buscando la analogía con el varón, hace tiempo que éstos ya pueden criopreservar esperma para su uso futuro, tanto por razones médicas como sociales; por ejemplo, antes de someterse a una vasectomía, a una exposición a agentes gonadotóxicos por motivos laborales o incluso algunos deportistas de élite en previsión de posibles consecuencias negativas fruto de su actividad. Si aceptamos para estos casos la preservación de la fertilidad en el hombre, sabiendo incluso que los efectos de la edad en su capacidad reproductiva no son tan determinantes como en la mujer, ¿por qué no aceptarlo también para las mujeres? Parece lógico prevenir los efectos de la edad antes de sufrir sus consecuencias.

Ante una nueva opción como ésta, sólo queda matizar que la aplicación indiscriminada no parece la alternativa preferencial, ya que la concienciación

social hacia una maternidad en edades biológicamente apropiadas es la opción más sensata. Ello no impide sin embargo que en circunstancias determinadas en las que se prevea un retraso por motivos sociales, no pueda gestionarse el momento de tener descendencia recurriendo a esta opción de forma preventiva.

Para asegurar el éxito de un programa de preservación de la fertilidad, la información será clave en todo momento. La mujer deberá ser debidamente informada de los riesgos y beneficios de la técnica, así como, firmar un consentimiento informado específico para este fin. Se deberá valorar también su intención reproductiva a largo plazo y asegurar el destino final del material criopreservado, en el supuesto de que no lo necesite para su propia reproducción.



Everything  
you need for  
successful IVF.

## From aspiration to transfer

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

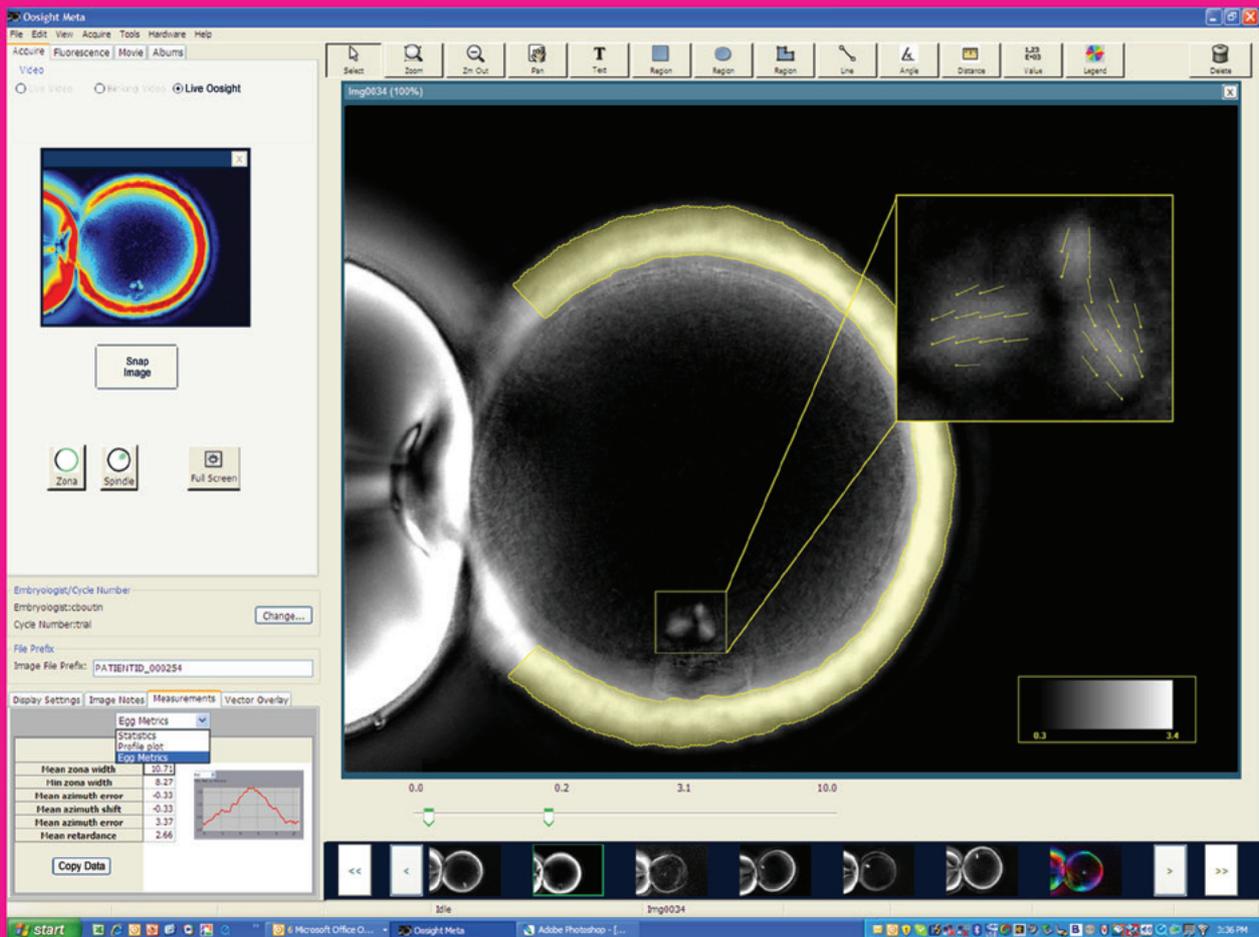
approach all the way. The benefits are clear - we help you achieve great results with guaranteed reliability throughout the whole process.



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

**Vitrolife**   
Innovative Cell and Tissue Technology

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



## **VITRIFICACIÓN DE OOCITOS PARA ELEGIR EL MOMENTO DE GESTAR**

María Morales, Marta Sánchez de Burgos, Jorge Cuadros  
Clínica FivMadrid

Aunque la técnica de vitrificación no es en absoluto moderna, es verdad que hace relativamente poco tiempo que Kuwayama consiguió ponerla a punto para su uso en la clínica. Ahora, la posibilidad de criopreservar oocitos con una alta probabilidad de supervivencia, es una realidad; de tal manera que esta técnica nos permite ahora ofrecer una alternativa que hace sólo 5 años apenas nos planteábamos.

Y como resultado de ello, así como existen bancos de semen hace décadas, ahora es posible establecer un banco de oocitos.

Existen algunas posibilidades clínicas incuestionables para la aplicación de esta técnica, como por ejemplo las pacientes oncológicas. Vitrificar los oocitos de estas pacientes les abre una nueva esperanza para recuperar su

proyecto reproductivo una vez curadas.

Sin embargo, el debate en cuestión se refiere más bien a la posibilidad que ahora tienen mujeres sanas de retrasar su maternidad “por capricho”. El “capricho” puede implicar desde la realización de objetivos profesionales, hasta la consideración de la inconveniencia de una gestación en un momento determinado de la vida, pasando por la ausencia de pareja (si es que a la mujer le preocupara esta circunstancia).

Y la pregunta podría ser, sencillamente, ¿por qué no?

¿Cuál es el problema? Evidentemente, las mujeres deberían ser correctamente informadas sobre que este retraso de la maternidad no puede prolongarse indefinidamente, por las consecuencias

que puede tener en la gestación la edad avanzada de una mujer (¿más de 50?).

Aparte de esto, no debería haber un cuestionamiento ético, puesto que no habría diferencia con las pacientes que ya atendemos en la donación de óvulos.

Pero, ¿es lícito para la mujer aprovechar lo que la ciencia ahora le puede permitir, el “capricho” de retrasar su maternidad, por el motivo que sea?

Nuestra opinión es que se trata de una técnica segura, que está dando resultados óptimos; por lo tanto no hay razón para objetar su utilización por las mujeres que lo requieran. Es lo que se espera de un avance científico, en el entorno de la ley, en un estado de derecho, sin entrar por supuesto en cuestionamientos morales o religiosos.

## **¿POR QUÉ NOSOTROS NO ENVÍAMOS LOS DATOS AL REGISTRO SEF?**

Antonio Urrés  
Reproducción Asistida Quirón Zaragoza

Por si no ha quedado claro en el título lo repito: Quirón Zaragoza no ha enviado sus datos al registro SEF 2008. Pero tampoco lo hizo el 2007, ni el 2006, 2005, 2004. Quirón Zaragoza nunca ha enviado sus datos al Registro SEF. Y no es porque pertenezca a ningún grupo de opinión, ni porque considere que no puede ser muy interesante el disponer de un registro como éste (todo lo contrario), sino por el hecho de que siempre me ha parecido que se ha ido creando a espaldas de nuestra asociación (léase ASEBIR).

Es por ello que tenía mucha curiosidad en comprobar el interés que despertaba este debate dentro de los asociados de ASEBIR, máxime cuando se trata de un debate generado dentro de una sociedad como la SEF en la que, desgraciadamente, los embriólogos no acabamos de vernos muy representados (sólo hace falta ver el bajo número de asociados de ASEBIR que lo son también de la SEF).

Algo parece que está cambiando cuando se plantea este debate en nuestra revista, además de una forma tan precipitada. Me sorprendió que se cambiara el tema inicial de debate “Vitrificación de ovocitos para retrasar la maternidad” por el de “Registro SEF 2008” de una forma tan inesperada. ¿A qué venían estas prisas? No creo que fuera porque se hubiera despertado entre los asociados un repentino interés en este tema, pero en cambio me ha resultado curiosa la forma como los dos grupos de opinión enfrentados en la SEF han trasladado claramente su debate a nuestra revista.

No voy a entrar a opinar sobre ninguna de las dos posturas. Repito que nunca lo he considerado mi debate. Y si me lo preguntaran, que nunca me ha parecido que nos lo preguntaran, diría que ambas tienen su punto de razón. Y si realmente hubiera interés en conocer nuestra

opinión, podría abrirse un debate interno dentro de ASEBIR en el que pudiéramos opinar sobre las auditorías, el registro abierto de centros, la búsqueda de la homogeneidad de los datos,... y hasta sobre algún que otro dato que nosotros (los embriólogos) echamos en falta. Pero creo que nunca nos lo han preguntado. Por lo menos hasta ahora. Y ya parece tarde.

Una vez dicho eso. Me gustaría saber cual es la postura oficial de ASEBIR al respecto. Y si ASEBIR, representada por nuestra actual Junta Directiva, se une decididamente a esta iniciativa, y así lo manifiesta, me parecerá estupendo. Y a partir del año 2010 Quirón Zaragoza enviará también sus datos al registro SEF-ASEBIR (sonaría bien ¿no?). Sólo espero que eso igualmente signifique que vamos a “pintar” un poco más dentro de la Sociedad Española de Fertilidad.

## ¿CÓMO Y POR QUÉ SE PRODUCE LA SEÑALIZACIÓN POR ONDAS DE $Ca^{2+}$ DURANTE LA FECUNDACIÓN?

### HOW AND WHY IS TRIGGERED THE CALCIUM WAVES-MEDIATED SIGNALING DURING FERTILIZATION?

Aida M. López-Guerrero<sup>1</sup>, Vanessa Casas-Rua<sup>2</sup>, Mario J. Perianes<sup>2</sup>, Patricia Tomás-Martín<sup>1</sup>, Eulalia Pozo-Guisado<sup>1</sup>, Ignacio Santiago Álvarez-Miguel<sup>2,3</sup>, Francisco Javier Martín-Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz.

<sup>3</sup>Instituto Extremeño de Reproducción Asistida-González Carrera (IERA-GC), Badajoz.

e-mail: fjmartin@unex.es

#### RESUMEN

La señalización mediada por  $Ca^{2+}$  es esencial en la fecundación de mamíferos ya que las variaciones en la concentración intracelular de este ión que se generan en el ovocito, conocidas como ondas de  $Ca^{2+}$ , controlan casi todos los procesos necesarios para la progresión normal de la transición ovocito-zigoto-embrión. En este artículo nos centraremos en la descripción de los últimos avances en el estudio de los diferentes transportadores de  $Ca^{2+}$  en el ovocito que nos permitirán comprender la base molecular del origen de las ondas de  $Ca^{2+}$ , de su transmisión por el citosol del ovocito, así como de sus consecuencias funcionales. La señalización mediada por  $Ca^{2+}$  es responsable de la activación de diferentes quinasas que controlan procesos relacionados con la salida del bloque meiótico y la evolución del ciclo celular. Además, dedicaremos un apartado para mostrar la participación de la entrada de  $Ca^{2+}$  regulada por depósitos intracelulares (store-operated calcium entry, SOCE) en la señalización ovocitaria durante la fecundación, y la especial sensibilidad de esta vía de entrada de  $Ca^{2+}$  al estrés oxidativo generado por la manipulación de los ovocitos durante su cultivo *in vitro*. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):45-53.

Palabras clave: Calcio, fecundación, STIM1, canal SOC, estrés oxidativo

#### SUMMARY

Calcium signaling in the mammalian oocyte is essential at fertilization. The repetitive and transient increases of the intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration, known as calcium waves, control almost all the oocyte events required for the progression of cell cycle and the zygote-embryo transition. In this review we will focus on the description of the recent knowledge regarding  $Ca^{2+}$  transport systems, required for the better understanding of the molecular basis of the generation and transmission of the calcium waves, as well as for the functional consequences in the oocyte.  $Ca^{2+}$ -mediated signaling activates a series of protein kinases that control many cellular aspects, including the  $Ca^{2+}$  influx, the exit of meiotic arrest and cell cycle progression. In addition we will describe the contribution of the store-operated calcium entry (SOCE) to the  $Ca^{2+}$ -dependent signaling in the mammalian oocyte at fertilization. Finally we will show how this  $Ca^{2+}$ -influx is functionally altered by the oxidative stress generated by the culture media during the handling and *in vitro* culture of gametes during assisted reproduction techniques. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15(2):45-53.

Keywords: Calcium, fertilization, STIM1, SOC channel, oxidative stress

#### 1. CALCIO COMO MENSAJERO INTRACELULAR

Entre los numerosos mensajeros intracelulares que podemos encontrar en las células eucariotas, la concentración de calcio citosólico destaca por su importancia ya que se encuentra implicada en un elevado número de eventos celulares, desde el control del ciclo celular hasta la muerte celular, ya sea apoptótica o necrótica, pasando por otros procesos como la transmisión de

impulsos nerviosos, la contracción muscular, secreción, o fecundación. Sin embargo no es la concentración de calcio total la que actúa como señalizador, sino la concentración de calcio libre. En el citosol de las células eucariotas la concentración de  $Ca^{2+}$  libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es aproximadamente 100 nM, muy inferior a la concentración de  $Ca^{2+}$  libre extracelular ( $[Ca^{2+}]_o$ ) que suele ser 1-2 mM. Para mantener este gradiente de concentración se requiere la extrusión activa de  $Ca^{2+}$  al medio extracelular, acción

que se lleva a cabo mediante bombas de  $Ca^{2+}$  denominadas  $Ca^{2+}$ -ATPasas. Encontramos varios tipos de  $Ca^{2+}$ -ATPasas en la célula, una de ellas localizada en la membrana plasmática, que se denomina PMCA, por sus siglas en inglés (plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase). La PMCA emplea la energía liberada por la hidrólisis de ATP (adenosina 5'-trifosfato) para impulsar el transporte de  $Ca^{2+}$ , en contra del gradiente de concentración, hacia el exterior de la célula (véase la

figura 1). A esta extrusión también colaboran otros sistemas, como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que extruye  $\text{Ca}^{2+}$  gracias a la energía obtenida por el transporte de  $\text{Na}^+$  desde el medio extracelular al citosol.

veremos más adelante. El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a la estimulación es muy variado en cuanto a frecuencia, duración y amplitud, dependiendo del tipo celular e incluso dentro del mismo tipo celular dependiendo del estado fisiológico o de la fase del ciclo celular.

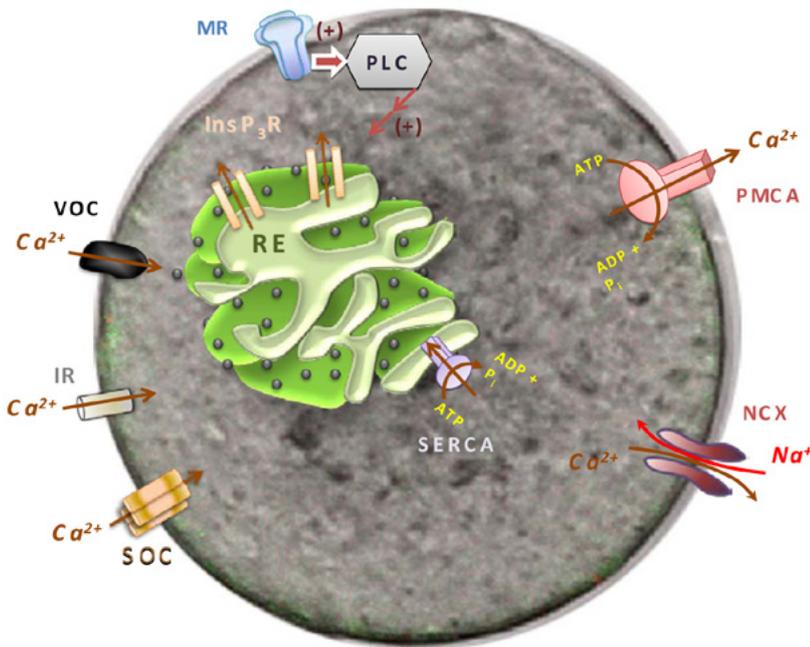
concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intraluminales muy superiores a los niveles citosólicos. Además, en la membrana del RE existen canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que permiten la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE al citosol. Entre estos canales podemos destacar los receptores de  $\text{InsP}_3$  (inositol 1,4,5-trisfosfato), o  $\text{InsP}_3\text{R}$ , que se activan tras la unión a este ligando intracelular, permitiendo la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE e incrementando temporalmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Aunque existen muchos otros participantes en la regulación del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en ovocitos, éstos son los actores principales en el esquema actualmente aceptado de la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  en fecundación.

## 2. SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR $\text{Ca}^{2+}$ EN LA FECUNDACIÓN OOCITARIA: ONDAS DE $\text{Ca}^{2+}$

Tal y como hemos mencionado antes, la fecundación representa un estímulo mediado por variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el citosol del ovocito. Durante la fecundación de ovocitos de diferentes especies podemos observar un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que puede alcanzar valores de 1-3  $\mu\text{M}$ . Este incremento es diferente tanto en tiempo global, como en frecuencia y amplitud dependiendo de las especies (Stricker, 1999), aunque para abreviar nuestra descripción nos centraremos en los ovocitos de mamíferos. En mamíferos, incluyendo la especie humana, tras la fusión espermatozoide-ovocito se producen elevaciones transitorias y repetitivas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que son iguales en amplitud (es decir todas alcanzan el mismo nivel de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, 1-3  $\mu\text{M}$ ), como en duración (aproximadamente 1-2 minutos cada una). Estas elevaciones transitorias son conocidas como ondas de calcio y, aunque se generan en un punto localizado del ovocito, se transmiten muy rápidamente al resto del citosol. La frecuencia de estas ondas varía entre especies, pero en la mayoría se producen con una cadencia de 1 onda cada 10-20 minutos.

¿Cómo se inicia y transmite el proceso generador de ondas de calcio? Actualmente se encuentra muy aceptado el hecho de que las ondas de calcio se inician por una actividad enzimática



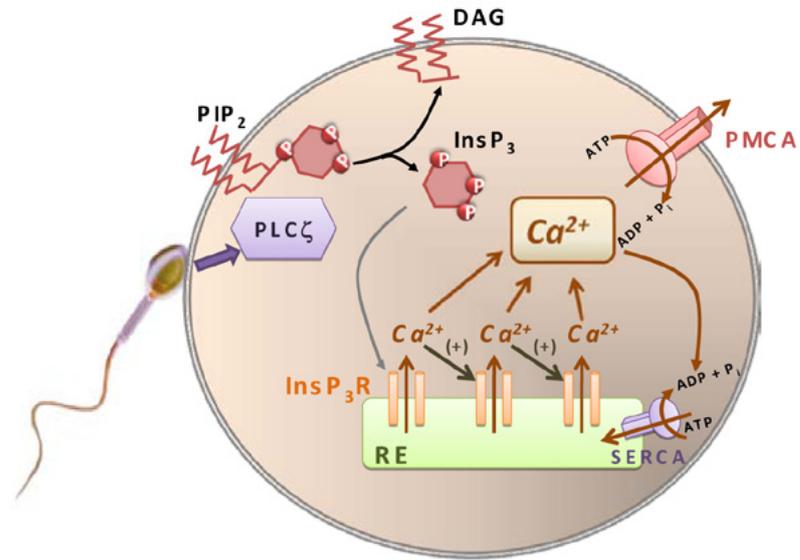
**FIGURA 1.** Principales sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula eucariota.  $\text{InsP}_3\text{R}$ , Receptor de inositol tris-fosfato; IR, receptor ionotrópico; MR, receptor metabotrópico; NCX, intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; PLC, fosfolipasa C; PMCA,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática; SERCA,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo endoplasmático; SOC: canal de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por depósitos intracelulares.

A pesar de que estos sistemas mantienen los niveles basales de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ésta sufre incrementos que pueden llegar hasta concentraciones micromolares en respuesta a una gran variedad de estímulos. El incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  viene facilitado por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol desde el exterior celular. También encontramos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en algunos orgánulos subcelulares, que permiten la salida parcial de  $\text{Ca}^{2+}$  desde estos orgánulos hacia el citosol. Es precisamente esta variación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lo que se considera un mensajero intracelular, o segundo mensajero, (casi) universal (Bootman et al., 2001). Los estímulos que conducen a un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son muy variados: desde la despolarización de la membrana plasmática en el caso de células excitables, como neuronas o miocitos, hasta la unión de hormonas a receptores de superficie, o la propia fusión espermatozoide-ovocito, como

En cualquier caso este incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  debe ser contrarrestado de alguna forma para que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos vuelvan a su nivel basal (aproximadamente 100 nM), transcurrido el estímulo. Es decir la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , como cualquier otro señalizador fisiológico, tiene un tiempo de duración limitado y además es reversible. El mecanismo principal para disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hasta niveles basales incluye los sistemas de extrusión localizados en la membrana plasmática antes mencionados (PMCA e intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) y de otro importante transportador activo que bombea  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hasta el principal depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , el retículo endoplasmático (RE). Este transportador se denomina  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo endoplasmático o SERCA (sarco(endo)plasmatic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) y permite que el RE actúe como reservorio o depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, alcanzándose

específica del espermatozoide. Tras la fusión de membranas entre espermatozoide y ovocito, la fosfolipasa C zeta (PLC $\zeta$ ) del espermatozoide es liberada al citosol del ovocito (Saunders et al., 2002). La actividad PLC $\zeta$  hidroliza el lípido de membrana fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$ ) produciendo cantidades significativas de inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP $_3$ ) y 1,2-diacilglicerol (DAG). Mientras que DAG es hidrofóbico y queda retenido en la membrana plasmática del ovocito, el InsP $_3$  es soluble y por lo tanto difunde con facilidad hacia el citosol. InsP $_3$  se une a su receptor, InsP $_3$ R, localizado en la membrana del RE y que tiene actividad como canal de Ca $^{2+}$ , activando la salida de Ca $^{2+}$  desde el interior del RE hacia el citosol (Malcuit et al., 2006) y de esta manera el espermatozoide induce la generación de la primera subida de la [Ca $^{2+}$ ] $_i$  en el ovocito (figura 2). Además el canal InsP $_3$ R presenta un modo de regulación que provoca su activación por el propio Ca $^{2+}$  citosólico, de modo que incrementos locales de la [Ca $^{2+}$ ] $_i$  en las cercanías de un receptor InsP $_3$ R activan a este receptor, permitiendo la salida de más Ca $^{2+}$  y activando a su vez a InsP $_3$ R vecinos, en un proceso conocido como liberación de Ca $^{2+}$  inducida por Ca $^{2+}$  (calcium-induced calcium release, CICR) que es la base de la transmisión de la onda de Ca $^{2+}$  al resto del ovocito.

Una vez generada la liberación de Ca $^{2+}$  desde el RE se activan mecanismos en el ovocito, como en otros tipos celulares, para restaurar los niveles basales de Ca $^{2+}$  citosólico que permitan generar una nueva onda de Ca $^{2+}$  con posterioridad. Entre estos mecanismos destaca la actividad de las bombas de Ca $^{2+}$ , PMCA y SERCA, que llevarán a cabo la extrusión de Ca $^{2+}$  al exterior celular y el bombeo al interior del RE, respectivamente. De esta forma se alcanza en pocos segundos el nivel basal de Ca $^{2+}$  citosólico. La PLC $\zeta$  va a continuar activa en el ovocito durante varias horas, concretamente hasta la formación de los pronúcleos, por lo que esta ruta de señalización (liberación de InsP $_3$   $\rightarrow$  unión a InsP $_3$ R  $\rightarrow$  salida de Ca $^{2+}$  desde el RE  $\rightarrow$  recaptura hasta el RE y extrusión al medio extracelular) va a ser predominante en el ovocito durante los primeros estadios de la fecundación. La proteína PLC $\zeta$  presenta en su extremo N-terminal una secuencia que determina



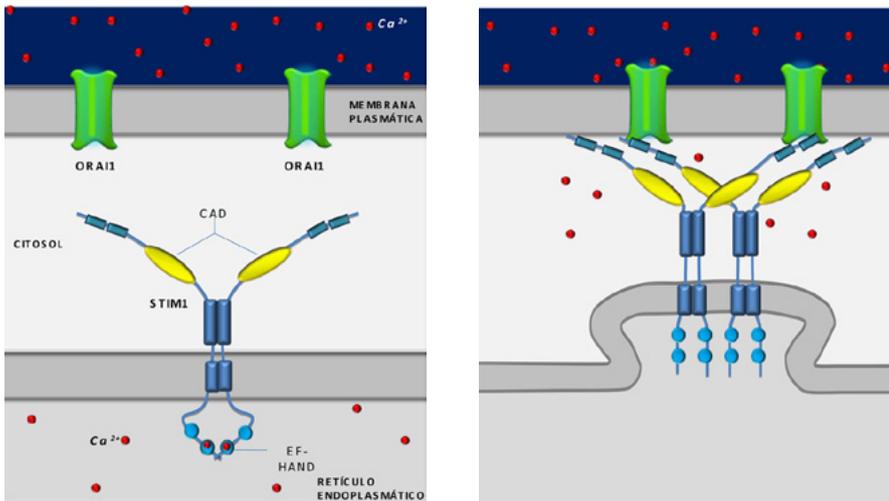
**FIGURA 2.** Generación de las ondas de Ca $^{2+}$  en el ovocito de mamíferos. DAG, 1,2-diacilglicerol; PIP $_2$ , fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato; PLC $\zeta$ , fosfolipasa C zeta.

su localización nuclear (Larman et al., 2004), por lo que en ausencia de membrana nuclear, como ocurre durante la metafase de la segunda división meiótica en ovocitos maduros, su localización es citosólica. De esta forma el ovocito se asegura un tren de ondas de Ca $^{2+}$  mientras no exista membrana nuclear. Cuando esta membrana se forma, la PLC $\zeta$  queda secuestrada en los pronúcleos, es decir sin acceso directo al citosol, por lo que deja de producirse InsP $_3$ , y el tren de ondas de Ca $^{2+}$  termina.

Es muy interesante el hecho de que una célula pueda mantener este tipo de señalización durante horas con el objetivo, como ya veremos más adelante, de salir del bloqueo meiótico en el que se encuentra el ovocito. Sin embargo, nuestro grupo de investigación se ha preguntado si la continua extrusión de Ca $^{2+}$  al exterior del ovocito (mediante la PMCA) en este tipo de señalización tan repetitiva no estaría disminuyendo los niveles de Ca $^{2+}$  dentro del RE, la fuente inicial de Ca $^{2+}$  para generar las ondas. De ser así, el agotamiento o depleción de los niveles de Ca $^{2+}$  intraluminales conduciría a la finalización temprana de las ondas de Ca $^{2+}$ , y por tanto al mantenimiento del bloqueo meiótico, es decir constituiría un fallo en la fecundación.

### 3. ¿CUÁLES SON LAS FUENTES DE Ca $^{2+}$ PARA LA GENERACIÓN DE ONDAS?

Para asegurar que los depósitos intracelulares de Ca $^{2+}$  dentro del ovocito (principalmente el RE) no sufren una depleción que ponga en peligro la continuidad de la señalización mediada por Ca $^{2+}$ , existe un sistema de canales de Ca $^{2+}$  en la membrana plasmática que están regulados precisamente por el nivel de Ca $^{2+}$  intraluminal en el retículo endoplasmático (Gomez-Fernandez et al., 2009; Koh et al., 2009). Estos canales de Ca $^{2+}$  permiten la entrada de Ca $^{2+}$  desde el exterior celular al citosol, para que la SERCA pueda bombear Ca $^{2+}$  al interior del RE, y así restaurar los niveles de Ca $^{2+}$  intraluminales. Por ello estos canales se denominan canales de Ca $^{2+}$  regulados por depósitos intracelulares, o canales SOC (store-operated Ca $^{2+}$  channels) y la entrada de Ca $^{2+}$  extracelular a través de estos canales SOC se denomina entrada de Ca $^{2+}$  regulada por depósitos intracelulares o SOCE (store-operated calcium entry). Esta vía de entrada, SOCE, se definió por primera vez en 1986 (Putney, 1986) y hoy sabemos que esta ruta de entrada de Ca $^{2+}$  es activa en todos los tipos celulares, incluyendo los ovocitos humanos (Martin-Romero et al., 2008b), aunque la contribución de esta vía a la señalización mediada por Ca $^{2+}$  difiere de un tipo celular a otro.

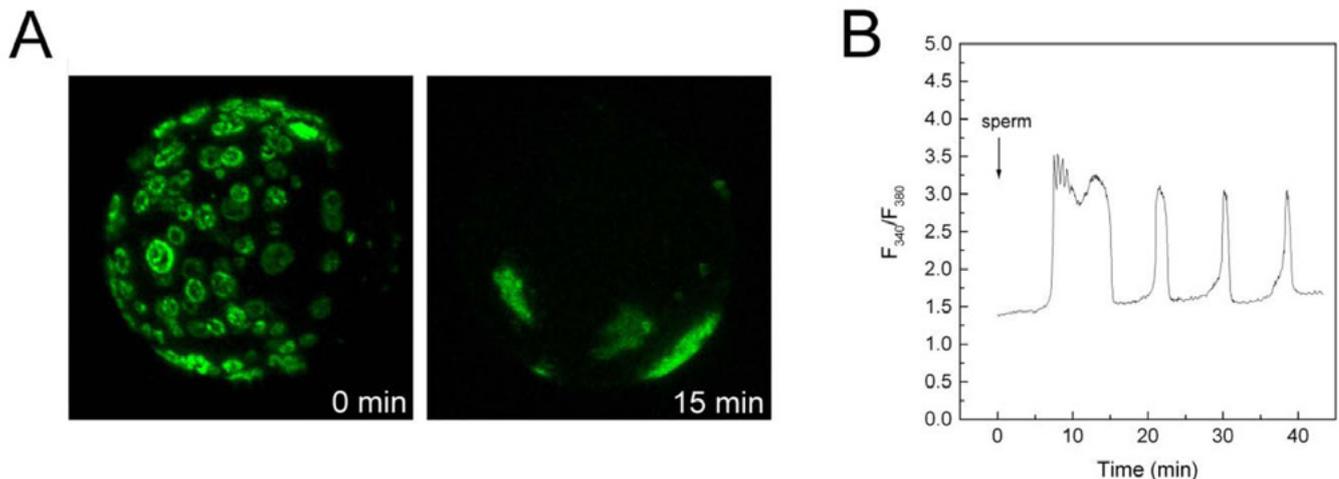


**FIGURA 3. Activación de canales SOC mediante la proteína de retículo endoplasmático STIM1.** El dominio EF-hand de la proteína STIM1 actúa como sensor de  $Ca^{2+}$  intraluminal. Tras la disminución de la concentración de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplasmático la proteína STIM1 sufre multimerización, seguida de una fuerte relocalización hacia la membrana plasmática, activando canales SOC, entre los que se encuentra ORAI1, mediante un dominio citoplasmático de unos 100 aminoácidos denominado dominio CAD (CRAC activation domain). Este dominio interacciona directamente con ORAI1, permitiendo su apertura para facilitar la entrada de  $Ca^{2+}$  hacia el citosol. Adaptado de (Cahalan, 2010).

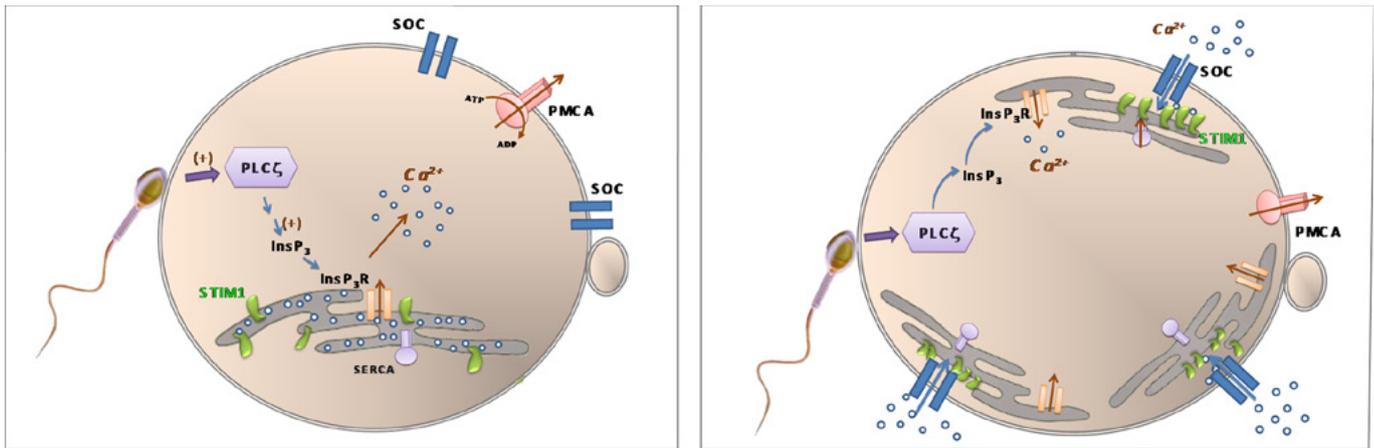
Los mecanismos por lo cuales los canales SOC localizados en la membrana plasmática son sensibles al nivel de llenado del RE están aún por aclarar, aunque es conocido que en este mecanismo participa una proteína denominada STIM1 (stromal interaction protein 1) (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). STIM1 es una proteína transmembranal localizada en la membrana del RE, con un dominio "EF-hand" de unión a  $Ca^{2+}$ , cerca del extremo N-terminal, que le permite actuar como sensor de  $Ca^{2+}$  intraluminal. El dominio citosólico presenta varios dominios entre los que destaca un doble dominio "coiled-coil" cuya función es la activación de canales SOC localizados en la membrana plasmática (figura 3).

Cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  dentro del RE disminuye por debajo de 200  $\mu M$ , STIM1 sufre oligomerización y se produce la aproximación de STIM1 hacia la membrana plasmática, formándose yuxtaposiciones RE-membrana plasmática (Liou et al., 2007; Muik et al., 2008; Smyth et al., 2008). Esta oligomerización es necesaria para la activación de los canales SOC de membrana plasmática. De esta forma gracias a STIM1 se establece un puente entre el exterior celular y el RE para reponer la concentración de  $Ca^{2+}$  dentro de este orgánulo y asegurar que el RE no sufrirá grandes cambios de concentración de  $Ca^{2+}$ , permitiendo la continuidad de las ondas de  $Ca^{2+}$  durante un largo periodo de tiempo. Empleando un modelo murino, nuestro

grupo de investigación ha demostrado recientemente que la proteína STIM1 es funcionalmente activa en ovocitos (Gomez-Fernandez et al., 2009), y que la activación de los canales SOC es un proceso muy temprano en la fecundación ( $\approx 10$  minutos tras el inicio de la fecundación), lo que apoya la hipótesis de que esta vía de entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular (SOCE) no sólo constituye un modo de mantener la señalización mediada por  $Ca^{2+}$  a largo plazo, sino que probablemente participa en la generación de las primeras ondas de  $Ca^{2+}$ . Esta hipótesis se sustenta en dos hechos constatados experimentalmente: (a) cuando se transfieren los ovocitos a una solución libre de  $Ca^{2+}$ , la señalización mediada por  $Ca^{2+}$  cesa inmediatamente (Kline and Kline, 1992), y (b) la relocalización de STIM1 se observa de forma concomitante a la generación de la primera onda de  $Ca^{2+}$  (Gomez-Fernandez et al., 2009) (ver figura 4). Por ello nuestro grupo ha propuesto una modificación al esquema hasta ahora aceptado y mostrado en la figura 2, en la que se incluye la participación temprana de STIM1. De esta forma, tras la liberación de PLC $\zeta$  al citosol, se produciría una salida masiva de  $Ca^{2+}$  desde el RE, lo que llevaría asociado una fuerte relocalización de STIM1 para activar canales SOC que permitirían la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el exterior celular contribuyendo a la generación de las ondas de  $Ca^{2+}$  (figura 5). Esto explicaría que los ovocitos requieran  $Ca^{2+}$  extracelular durante su fecundación y terminaría por contestar la pregunta inicial: *las fuentes de  $Ca^{2+}$  para la generación de ondas son el RE y el medio extracelular.*



**FIGURA 4. Relocalización de STIM1 durante la fecundación de ovocitos de ratón.** Panel A: Ovocitos libres de zona pelúcida (ZP) se expusieron a esperma durante 15 min, tras lo cual se llevó a cabo la inmunolocalización de STIM1. Panel B: Ovocitos libres de ZP se cargaron con fura-2-AM y se determinó el ratio  $F_{340}/F_{380}$  para el cálculo de la  $[Ca^{2+}]_i$ , tras la exposición a espermatozoides como en el panel anterior. Imagen adaptada de (Gomez-Fernandez et al., 2009).



**FIGURA 5. Esquema propuesto de la señalización mediada por  $Ca^{2+}$  durante la fecundación de ovocitos de mamífero.** La activación de los  $InsP_3R$ , debida al incremento en la generación de  $InsP_3$  por la  $PLC\zeta$  del espermatozoide, conduce a una primera salida de  $Ca^{2+}$  desde el RE. Esta salida va acompañada de la relocalización de  $STIM1$  que se aproxima a la membrana plasmática, donde activa canales  $SOC$  para estimular la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular y facilitar: (1) el incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico necesario para la generación de las ondas de  $Ca^{2+}$ , y (2) el llenado del RE que mantenga su funcionalidad durante todo el tiempo que permanece activa esta señalización.

#### 4. EL INFLUJO DE $Ca^{2+}$ A TRAVÉS DE CANALES $SOC$ ES SENSIBLE A ESTRÉS OXIDATIVO

Según lo expuesto sería muy interesante conocer la naturaleza molecular de estos canales de  $Ca^{2+}$ , los canales  $SOC$ , que se expresan y son activos en el ovocito. Durante más de dos décadas los investigadores han tratado de definir qué proteínas eran las encargadas de constituir los canales  $SOC$  empleando otros tipos celulares, y no fue hasta el año 2006 cuando se describió  $ORAI1$  (también conocida como  $CRACM1$ ), una proteína de membrana plasmática con cuatro segmentos transmembranales que constituye el canal responsable de la entrada de  $Ca^{2+}$  regulada por depósitos intracelulares (Feske et al., 2006; Soboloff et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006). Además de unirse a  $ORAI1$ ,  $STIM1$  se une a otros canales de  $Ca^{2+}$ , impulsando de esta forma su actividad como canal  $SOC$ : los canales de la familia  $TRPC$  (transient receptor potential canonical channels) (Yuan et al., 2007). Hoy conocemos que  $STIM1$  interacciona directamente, además de con  $ORAI1$ , con  $TRPC1$ ,  $TRPC4$  y  $TRPC5$ , e incluso forma interacciones heteroméricas con  $TRPC1$  y  $ORAI1$ , constituyendo complejos  $TRPC1-ORAI1-STIM1$  que actúan como canales  $SOCs$  con diferentes propiedades de conductancia (Ambudkar et al., 2007). Sin embargo, los canales  $TRPC$  pueden actuar de forma dependiente de  $STIM1$  o de forma independiente de  $STIM1$ , y es el ratio  $STIM1/TRPC$  lo que determina que estos canales actúen regulados

dependiendo del nivel de llenado del RE, o independientes de este nivel, es decir que actúen como canales  $SOC$  o no (Lee et al., 2010).

Debido a su papel fundamental en la generación de ondas de  $Ca^{2+}$  durante la fecundación resulta necesario determinar qué proteínas actúan como canales  $SOC$  en el ovocito, ya que este estudio nos permitirá no sólo avanzar en el conocimiento en este área de la biología reproductiva, sino aprovechar esta información con efectos prácticos durante el empleo de técnicas de reproducción asistida, puesto que los diversos canales muestran diferente farmacología. Con este objetivo nuestro grupo de investigación trabaja actualmente en la identificación de estos canales en ovocitos de ratón, y en la evaluación de su participación activa en la señalización mediada por  $Ca^{2+}$  en fecundación. Además de esta identificación molecular hemos constatado que *la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de estos canales es muy sensible a especies reactivas de oxígeno* (reactive oxygen species, ROS) generadas en el medio de cultivo (Martin-Romero et al., 2008b). Este hecho es de una importancia crítica, puesto que los gametos, durante su manipulación en el laboratorio y durante su cultivo *in vitro*, están expuestos a niveles de ROS muy superiores a los que se generan en situaciones fisiológicas debido principalmente a que la tensión de oxígeno ( $O_2$ ) atmosférica es significativamente mayor que la tensión de  $O_2$  *in vivo*.

Empleando sondas sensibles a diversas ROS hemos demostrado que los medios de cultivo comerciales habitualmente empleados en centros de reproducción asistida generan ROS, entre las que destaca peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ya que se pueden llegar a alcanzar concentraciones de esta especie del orden de micromolar (Martin-Romero et al., 2008a). Este hecho puede explicarse en base a la combinación de luz +  $O_2$  atmosférico + presencia en los medios de cultivo de agentes fotosensibles como la riboflavina, aminas, nucleótidos de piridina, etc., que pueden actuar como generadores fotoquímicos de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y oxígeno singlete (Cunningham et al., 1985; Michelson, 2000; Wells-Knecht et al., 1995). La generación de  $O_2^-$  potencia la formación de  $H_2O_2$  y éste último reacciona con  $O_2^-$  (reacción de Haber-Weiss) para producir radicales hidroxilo y peróxido (Michelson, 2000), amplificando la generación de ROS. El líquido folicular por el contrario no produce cantidades significativas de ROS y los niveles de  $H_2O_2$  en este fluido se encuentran en el intervalo submicromolar (Martin-Romero et al., 2008a).

La exposición de los ovocitos a concentraciones micromolares de  $H_2O_2$  de forma sostenida durante todo el proceso de aislamiento de los ovocitos, desnudación y posterior FIV/ICSI, conduce a la disminución del contenido en glutatión reducido (GSH), un importante antioxidante no enzimático intracelular, así como al incremento de la peroxidación lipídica

(Martín-Romero et al., 2008a), y todos estos procesos conducen finalmente a la desregulación de la homeostasis de  $Ca^{2+}$  libre citosólico.

En trabajos paralelos hemos descrito que la desregulación inducida por estrés oxidativo se produce fundamentalmente por una sobrecarga del ovocito debido a la entrada descontrolada de  $Ca^{2+}$  a través de canales SOC (Martín-Romero et al., 2008b). Esta desregulación tiene una importante consecuencia, la finalización temprana de la generación de las ondas de  $Ca^{2+}$  y por lo tanto el mantenimiento del bloqueo meiótico. Hemos observado que el empleo de bloqueantes específicos de canales SOC protege al ovocito de esta sobrecarga de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, no es posible usar de forma rutinaria bloqueantes de canales SOC en medios de cultivo ya que *la entrada controlada y regulada de  $Ca^{2+}$  a través de estos canales SOC (la entrada regulada por STIM1) es necesaria para el progreso de la fecundación*. Por ello, nuestra recomendación, a la luz de nuestros propios datos experimentales, es que se deben acortar los tiempos de incubación de ovocitos en los tampones y medios de cultivo en la medida de lo posible, mientras que es posible prolongar los tiempos de espera en el propio líquido folicular o en medios de cultivo de composición química sencilla (Martín-Romero and Álvarez, 2008; Martín-Romero et al., 2008a; Varghese et al., 2010, In press). De hecho existen resultados experimentales que apoyan esta recomendación, ya que en un modelo murino las tasas de embarazo tras FIV y posterior cultivo embrionario son superiores cuando el cultivo se lleva a cabo en un medio químicamente definido en comparación con medios más complejos suplementados con suero (Han and Kiessling, 1988).

## 5. LAS ONDAS DE $Ca^{2+}$ SE REQUIEREN PARA LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

La generación de las ondas de  $Ca^{2+}$  durante la fecundación sigue un patrón específico muy determinado. Hemos visto hasta ahora cómo y por qué se generan estas ondas, pero ¿Cuál es su función? ¿Cuál es la diana molecular

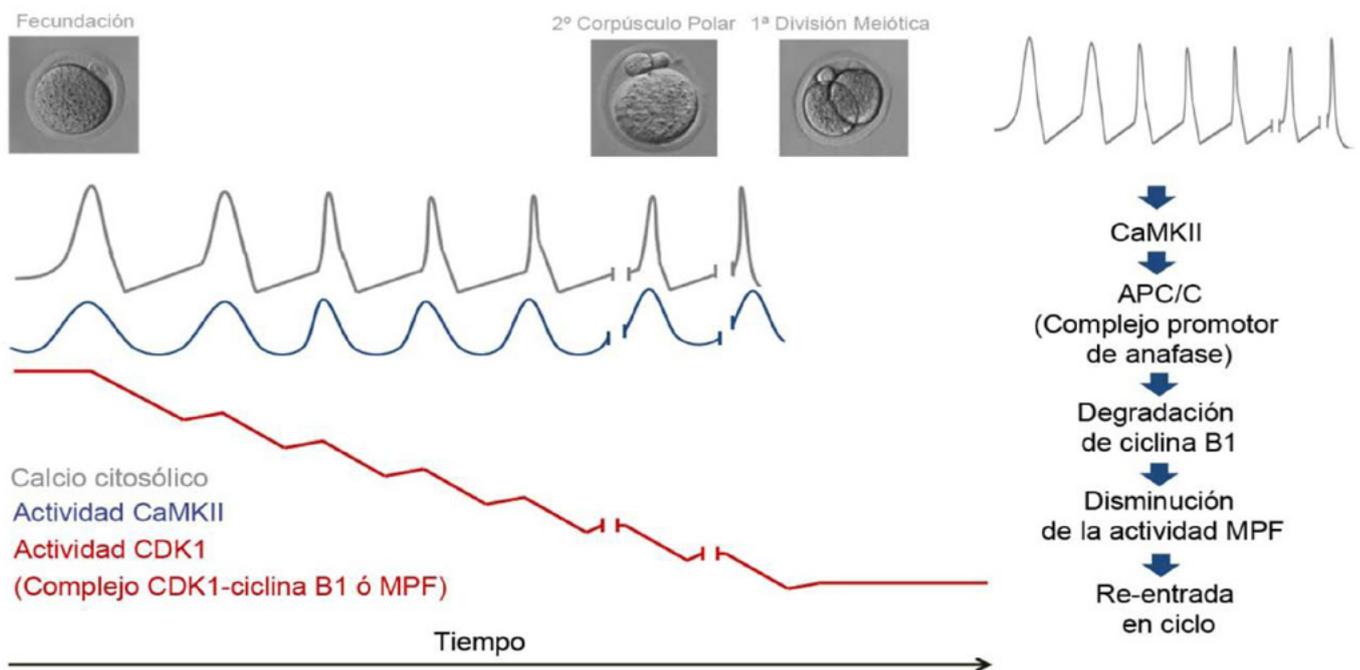
que se activa gracias a estas ondas? ¿Qué relación hay entre estas ondas y la salida del bloqueo meiótico? En primer lugar hay que aclarar que las dianas moleculares activadas por el tren de ondas de  $Ca^{2+}$  es múltiple, pero destacan una serie de proteínas quinasas, entre ellas la extracelular signal-regulated kinase 1 y 2 (ERK1/2),  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), protein kinase C (PKC) y la cyclin dependent kinase 1 (CDK1 o p34<sup>cdc2</sup>), por su estrecha relación con la salida del bloqueo meiótico que se produce durante la fecundación (Ducibella and Fissore, 2008).

Las quinasas ERK1/2 se activan por incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$ , y aunque esta activación es indirecta tiene particular relevancia ya que nuestro grupo ha descrito recientemente que STIM1 es diana de la actividad ERK1/2 tanto *in vitro* como *in vivo*, y que la fosforilación de STIM1 en residuos de serina dianas de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621) es necesaria para que puedan activarse los canales SOC (Pozo-Guisado et al., 2010), permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular para continuar con la generación de ondas de  $Ca^{2+}$ . Aunque inicialmente se sugirió que la PKC también podría regular positivamente la entrada de  $Ca^{2+}$  (Halet et al., 2004), hemos comprobado que STIM1 no es diana de PKC y recientemente se ha descrito que PKC fosforila a ORAI1, pero esta fosforilación conduce a su inhibición como canal SOC y no a su activación (Kawasaki et al., 2010).

En 2002 se describió que la actividad del complejo MPF (M-phase Promoting Factor), que mantiene el bloqueo meiótico en los ovocitos maduros MII, se regula de forma proporcional al número de oscilaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y al tiempo total en el que la  $[Ca^{2+}]_i$  permanece elevada (Nixon et al., 2002). El complejo MPF está constituido por la quinasa CDK1 que actúa como subunidad enzimática, y por la ciclina B1, que actúa como subunidad reguladora (Labbe et al., 1989). Una elevada actividad del complejo MPF es responsable del bloqueo meiótico, pero la disminución de los niveles de ciclina B1, conduce a una disminución de la actividad del complejo MPF y a la salida del bloqueo meiótico. Durante

la fase M del ciclo celular la cantidad de ciclina B1 está regulada por su proteólisis controlada mediante el proteosoma 26S. La degradación de la ciclina B1 está estimulada por su poli-ubiquitinación, una modificación post-traducciona que consiste en incorporar cadenas de ubiquitina (Ub, una proteína de 76 aminoácidos) unidas a residuos de lisina de la diana molecular. Esta modificación post-traducciona es debida a una serie de enzimas específicas, denominadas genéricamente E3 ligasa, que reconocen el sustrato para ser marcado con poli-Ub. En el caso de la ciclina B1, la E3 ligasa del complejo APC/C (anaphase promoting complex) es la responsable de su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S. El grupo de Keith T. Jones demostró empleando ovocitos de ratón que la degradación de ciclina B1 dependiente de APC/C se inicia cuando la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  en el ovocito supera un umbral mínimo ( $\approx 600$  nM), tras la fecundación. Sin embargo esta degradación no es completa tras la primera onda de  $Ca^{2+}$  como ocurre en *Xenopus* y en otros organismos en los que sólo se observa un único aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la fusión espermática (una única onda). Para continuar con la degradación de la ciclina B1 se requieren en mamíferos múltiples ondas de  $Ca^{2+}$  y cada una de ellas solapa con una disminución significativa en el nivel de ciclina B1 y, de forma consecuente, en la actividad MPF responsable del bloqueo meiótico (Nixon et al., 2002). Como consecuencia, tras una serie de ondas de  $Ca^{2+}$  de forma repetitiva, la ausencia de ciclina B1 conduce finalmente al reinicio del ciclo celular con la conclusión de la meiosis.

Pero, ¿cuál es la conexión entre la  $[Ca^{2+}]_i$  y el complejo MPF? La respuesta se encuentra en la CaMKII, que controla indirectamente la actividad del complejo MPF. Es conocido desde hace casi dos décadas que existe una correlación entre la actividad CaMKII y la progresión del ciclo celular. La actividad de la CaMKII es regulada por el complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, lo que ha originado diversas hipótesis para explicar la relación que existe entre los incrementos cíclicos de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la



**FIGURA 6. Evolución de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , la actividad CaMKII y la actividad del complejo MPF durante la fecundación.** Las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  activan la CaMKII que a su vez activa la E3-ubiquitina ligasa del complejo APC/C para ubiquitinar la ciclina B1. La degradación de la ciclina B1 por el proteosoma 26S conduce a la re-entrada en ciclo celular por pérdida de la actividad MPF.

actividad CaMKII y el complejo MPF. En primer lugar hay que destacar que el aumento cíclico de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , como el que ocurre en fecundación, lleva asociado una estimulación de la actividad CaMKII también de forma cíclica, de forma que existe una elevada sincronización entre ambos eventos celulares (Markoulaki et al., 2004) (ver figura 6). Durante cada onda de activación de la CaMKII, ésta a su vez activa la E3 Ub ligasa del complejo APC/C, aunque esta activación es indirecta y en ella participan otros elementos (ver revisión en Ducibella and Fissore, 2008). La activación del complejo APC/C conduce a la poli-ubiquitinación de la ciclina B1 del complejo MPF y su degradación por el proteosoma 26S, estimulando la salida del bloqueo meiótico. En resumen, existe una elevada correlación causal y temporal entre onda de  $\text{Ca}^{2+}$  → activación de CaMKII → ubiquitinación de ciclina B1 (y su posterior degradación) → disminución de la actividad del complejo MPF.

## 6. CONSIDERACIONES FINALES

Teniendo en cuenta todo lo expuesto en esta revisión, cabe preguntarse por tanto, ¿qué ocurre cuando no se alcanza un número adecuado de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la fecundación oocitaria? ¿Qué ocurre cuando el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no alcanza el

umbral descrito de 600 nM para activar la CaMKII? La primera situación podría presentarse durante la actividad clínica en aquellos casos en los que se emplean espermatozoides defectivos en PLC $\zeta$ , o bien cuando se emplean ovocitos no maduros citosólicamente, es decir ovocitos que a pesar de mostrar un claro corpúsculo polar no muestran una elevada densidad de  $\text{InsP}_3$ . En todos estos casos no se conseguirá una sucesión de ondas con una frecuencia y amplitud adecuadas para degradar totalmente ciclina B1, por lo que el ovocito no progresará en ciclo celular. Por ello, los estudios encaminados a determinar marcadores moleculares de maduración citosólica resultan especialmente necesarios. La densidad de canales  $\text{InsP}_3$ , así como la densidad de bombas SERCA, son dos marcadores de maduración citosólica que pueden emplearse en estudios de maduración oocitaria y que podrían ser útiles para la evaluación de la eficiencia de diferentes medios de maduración *in vitro* (IVM). Por otro lado hemos destacado que los canales SOC del ovocito son especialmente sensibles a modulación redox, de modo que un incremento en el nivel ROS puede llegar a sobreactivar estos canales, alterando la frecuencia de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  y frustrando la fecundación. En definitiva, se requieren estudios básicos para

conocer todos los detalles moleculares que rigen la función de los principales transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ovocito, ya sean bombas o canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que nos permitan manipular estas células con el objetivo de asegurar tasas de éxito en FIV muy superiores a las actuales.

## AGRADECIMIENTOS

La financiación del grupo de investigación es llevada a cabo gracias a proyectos financiados en convocatorias competitivas del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-00104) y de la Junta de Extremadura-Fondo Social Europeo (PDT08A027). AML-G, VC-R, MJP, PT-M y EP-G están contratados con financiación de la Junta de Extremadura-Fondo Social Europeo y de la Universidad de Extremadura. Agradecemos a todo el personal del Instituto Extremeño de Reproducción Asistida-González Carrera su colaboración en la ejecución de los experimentos realizados con muestras de origen humano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay B, Cheng KT. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 2007; 42:213-223.

- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12:3-10.
- Cahalan MD. Cell biology. How to STIMulate calcium channels. *Science* 2010; 330:43-44.
- Cunningham ML, Krinsky NI, Giovanazzi SM, Peak MJ. Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *Free Radic Biol Med* 1985; 1:381-385.
- Ducibella T, Fissore R. The roles of Ca<sup>2+</sup>, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev Biol* 2008; 315:257-279.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, et al. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; 441:179-185.
- Gomez-Fernandez C, Pozo-Guisado E, Ganan-Parra M, Perianes MJ, Alvarez IS, Martín-Romero FJ. Relocalization of STIM1 in mouse oocytes at fertilization: early involvement of store-operated calcium entry. *Reproduction* 2009; 138:211-221.
- Halet G, Tunwell R, Parkinson SJ, Carroll J. Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization in mouse eggs. *J Cell Biol* 2004; 164:1033-1044.
- Han HD, Kiessling AA. In vivo development of transferred mouse embryos conceived in vitro in simple and complex media. *Fertil Steril* 1988; 50:159-163.
- Kawasaki T, Ueyama T, Lange I, Feske S, Saito N. Protein kinase C-induced phosphorylation of *Orai1* regulates the intracellular Ca<sup>2+</sup> level via the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem* 2010; 285:25720-25730.
- Kline D, Kline JT. Thapsigargin activates a calcium influx pathway in the unfertilized mouse egg and suppresses repetitive calcium transients in the fertilized egg. *J Biol Chem* 1992; 267:17624-17630.
- Koh S, Lee K, Wang C, Cabot RA, Machaty Z. STIM1 regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in oocytes. *Dev Biol* 2009; 330:368-376.
- Labbe JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, et al. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989; 8:3053-3058.
- Larman MG, Saunders CM, Carroll J, Lai FA, Swann K. Cell cycle-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci* 2004; 117:2513-2521.
- Lee KP, Yuan JP, So I, Worley PF, Muallem S. STIM1-dependent and STIM1-independent function of TRPC channels tunes their store-operated mode. *J Biol Chem* 2010; In Press.
- Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca<sup>2+</sup> store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:9301-9306.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., et al. STIM is a Ca(2+) sensor essential for Ca(2+)-store-depletion-triggered Ca(2+) influx. *Curr Biol* 2005; 15:1235-1241.
- Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol* 2006; 206:565-573.
- Markoulaki S, Matson S, Ducibella T. Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs. *Dev Biol* 2004; 272:15-25.
- Martin-Romero FJ, Álvarez IS. Reactive oxygen and nitrogen species in reproductive biology. En: Gutiérrez-Merino C, Leeuwenburgh C, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Research Signpost: Kerala (India); 2008.
- Martin-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Dominguez-Arroyo JA, Gonzalez-Carrera E, Alvarez IS. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008a; 17:652-661.
- Martin-Romero FJ, Ortiz-de-Galisteo JR, Lara-Laranjeira J, Dominguez-Arroyo JA, Gonzalez-Carrera E, Alvarez IS. Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. *Biol Reprod* 2008b; 78:307-315.
- Michelson AM. Photochemical production of oxy radicals. En: Greenwald RA, editor. *Handbooks of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press: Boca Raton, Florida; 2000. p. 71-75.
- Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P, et al. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 2008; 283:8014-8022.
- Nixon VL, Lévassieur M, McDougall A, Jones KT. Ca(2+) oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Curr Biol* 2002; 12:746-750.
- Pozo-Guisado E, Campbell DG, Deak M, Alvarez-Barrientos A, Morrice NA, Alvarez IS, et al. Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *J Cell Sci* 2010; 123:3084-3093.
- Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7:1-12.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca(2+) channel function. *J Cell Biol* 2005; 169:435-445.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royle J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129:3533-3544.
- Smyth JT, Dehaven WI, Bird GS, Putney JW, Jr. Ca<sup>2+</sup>-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J Cell Sci* 2008; 121:762-772.
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. *Orai1* and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006; 281:20661-20665.
- Stricker SA. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology* 1999; 211:157-176.

Varghese A, Pozo-Guisado E, Alvarez IS, Martin-Romero FJ. Extended Embryo Culture Supplementation. En: Agarwal A, editor. Male Infertility: Contemporary Concepts and the role of Antioxidants. Springer-Verlag: USA; 2010. En prensa.

Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, et al. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:9357-9362.

Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca(2+) entry. Science 2006; 312:1220-1223.

Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. Biochemistry 1995; 34:3702-3709.

Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. Nat Cell Biol 2007; 9:636-645.



REPROGENETICS

COMPROMETIDOS  
CON LA  
INNOVACIÓN  
EN DGP

DIRECTORES CIENTÍFICOS

Mireia Sandalinas - Carles Giménez

## ANÁLISIS DE TODOS LOS CROMOSOMAS MEDIANTE ARRAY CGH (aCGH24)

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

## Fertility 2011

*7th Biennial Conference of the UK Fertility Societies*

*January 5-7, 2011*

*Dublin Convention Centre, Dublin, IRELAND*

*<http://www.fertility2011.org/>*

## I Curso ASEBIR-AEBM de Análisis Seminal ante los nuevos criterios de la OMS

*27-28 Enero 2011*

*Hospital Materno-Infantil del Hospital Gregorio Marañón*

*Madrid*

## ASA 36th Annual Meeting

*American Society of Andrology*

*April 2-5, 2011*

*Hyatt Regency Montreal, Montreal, CANADA*

*<http://www.andrologysociety.com>*

## ASESA 2011

*15 Congreso Nacional de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva*

*29-30 Abril, 1 de Mayo 2011*

*Hotel Meliá*

*Palas Atenea*

*Palma de Mallorca*

## ESHRE 2011

*27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology*

*3 to 6 July 2011*

*Stockholm, Sweden*

## ASEBIR 2011

*VI Congreso Girona 2011*

*5-7 Octubre 2011*

*Auditori Palau de Congressos*

*Girona*

## ASRM 2011

*American Society for Reproductive Medicine*

*67th Annual Meeting*

*October 15-19, 2011*

*Orange County*

*Convention Center*

*Orlando, Florida*

## INDEXACIÓN DE LA REVISTA ASEBIR

La iniciativa de la Junta Directiva de ASEBIR y la Vocalía de Publicaciones para conseguir la indexación de nuestra Revista ASEBIR ha continuado durante este segundo semestre del año. Se ha confirmado la entrada de nuestra Revista en la base de datos de Biomedicina IME, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que recoge y analiza más de 330 revistas médicas españolas, y también en CUIDEN®, la base de datos de la Fundación Index, que incluye producción científica sobre Cuidados de Salud en el espacio científico Iberoamericano.

## VI CONGRESO ASEBIR, GIRONA 2011

La Vocalía de Congresos y el Comité Organizador del VI Congreso ASEBIR, continúan con su arduo trabajo para que nuestra próxima reunión sea un éxito más de nuestra asociación.

El plazo de entrega de comunicaciones finalizará el **15 de abril** de 2011 a las 15:00 hrs. y se informará de las comunicaciones que han sido aceptadas y su formato a partir del **20 de mayo de 2011**.

Hacemos hincapié en que el éxito de nuestra reunión depende de vuestra participación y de vuestras comunicaciones, cuya calidad damos por descontado.

## PROF. ROBERT EDWARDS PREMIO NOBEL DE MEDICINA 2010

ASEBIR felicita al Prof. Robert Edwards, padre de la Fecundación in Vitro, por la concesión a sus 85 años de edad del Premio Nobel de Medicina 2010 otorgado por el Instituto Karolinska de Suecia.

Edwards empezó en la década de los 60 investigando los mecanismos de la fecundación en el modelo animal antes de focalizar su trabajo en el tratamiento de la esterilidad humana. Sus esfuerzos se vieron coronados el 25 de julio de 1978 con el nacimiento de Louise Brown, la primera "bebé probeta".

Desde entonces, Edwards siguió trabajando para perfeccionar la técnica, y muy a menudo también para

defenderla de las numerosas polémicas que se suscitaron, principalmente en sus inicios. La aplicación de sus conocimientos ha supuesto una transformación radical en el tratamiento de la esterilidad humana permitiendo el tratamiento mediante la reproducción asistida, y más especialmente mediante la FIV, a miles de personas con problemas de esterilidad.

Hoy en día se estima que más de 4 millones de niños han nacido en el mundo gracias a esta importante aportación a la ciencia.

(Noticia publicada en [www.asebir.com](http://www.asebir.com))

## CERTIFICACIÓN ASEBIR EN REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA – EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

La certificación ASEBIR, que nos acredita como Embriólogos Clínicos, es ya una realidad, y, a la recepción de este número de la revista, los primeros socios que se encuentren además en posesión del Certificado de Embriólogo Clínico *Senior* de la ESHRE, habrán sido reconocidos con esta nueva acreditación. Sin embargo, para aquellos *Senior* que aún no lo hayan hecho, tienen plazo hasta marzo de 2011 para la vía de la convalidación. A continuación se iniciarán los procesos de certificación mediante las vías "rápida" y "mediante examen". Para mayor información podéis consultar nuestra página web en el enlace <http://www.asebir.com/es/actividad-asebir/actividades/noticias/certificacion-asebir-en-reproduccion-asistida-humana-embriologia-clinica/>

## NORMAS DE PUBLICACIÓN

### INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES. NORMAS DE PUBLICACIÓN

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

La revista ASEBIR se publica semestralmente por lo que es indispensable que los escritos para las secciones de Debates, Noticias y Agenda sean enviados:

- Antes del 31 de Marzo para el primer número del año (Junio)
- Antes del 30 de Septiembre para el segundo número del año (Diciembre).

### MANUSCRITOS:

Todos los trabajos remitidos deberán ser inéditos y se mandarán por correo electrónico a la dirección [asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com). Será necesaria una copia del artículo en formato PDF y una copia en Word, así como un documento de presentación en el cual se solicite su valoración y se indique la sección donde se desea su publicación. En este documento se hará constar que el trabajo no ha sido publicado previamente y que todos los autores están de acuerdo en su contenido y ceden los derechos de su publicación a ASEBIR. Para la reproducción de material ya editado es necesaria la autorización expresa de los propietarios del copyright. El Comité Editorial considerará la publicación de artículos enviados en inglés.

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

En la primera página de todos los trabajos se indicará, en el siguiente orden: título en castellano; título en inglés; nombre y un apellido de

cada uno de los autores y su centro de trabajo, y correo electrónico del primer autor. En la segunda página se incluirá un resumen y las palabras clave (ambos en castellano e inglés). Los autores se asegurarán de que las palabras clave, tanto en inglés como en español, se encuentren en los tesauros correspondientes del MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) y de la base de datos de BIREME (enlace "Consulta al DeCS" en <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>), respectivamente.

La estructura de los manuscritos preferentemente deberá organizarse en los apartados de Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Bibliografía, Tablas y Gráficas. Las tablas se numerarán con números romanos y las figuras con números arábigos. Los pies de figura deberán estar listados en una hoja aparte y cada figura llevará escrita su numeración.

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

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

### A) ARTÍCULO DE REVISTA CON MENOS DE 6 AUTORES:

Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human

sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* 1993; 59:418-423.

### B) ARTÍCULO DE REVISTA CON MÁS DE 6 AUTORES:

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

### C) LIBRO COMPLETO:

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

### D) CAPÍTULO DE LIBRO:

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

### E) COMUNICACIÓN A CONGRESO:

Bengston S, Solheim. Hatching assisted. XXII Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology; 1997 Jun 20-23; Roma, Italia. p. 1561-2.

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

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



# ASEBIR

## VI CONGRESO GIRONA 2011

Auditori Palau de Congressos de Girona

5, 6 Y 7 DE OCTUBRE



[www.vicongresoasebir.es](http://www.vicongresoasebir.es)

AUSPICIADO POR:



SECRETARÍA TÉCNICA:

Grupo Process · Betaprocess, S.L.

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

# ASEBIR

[asebir@asebir.com](mailto:asebir@asebir.com) | [www.asebir.com](http://www.asebir.com)

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

