

REVISTA

ASEBIR



ACTUALIDAD

La batalla por la Especialidad

AULA JOVEN

Multinucleación y desarrollo embrionario

FORMACIÓN CONTINUADA

Implicaciones de la longitud de los telómeros en la biología reproductiva

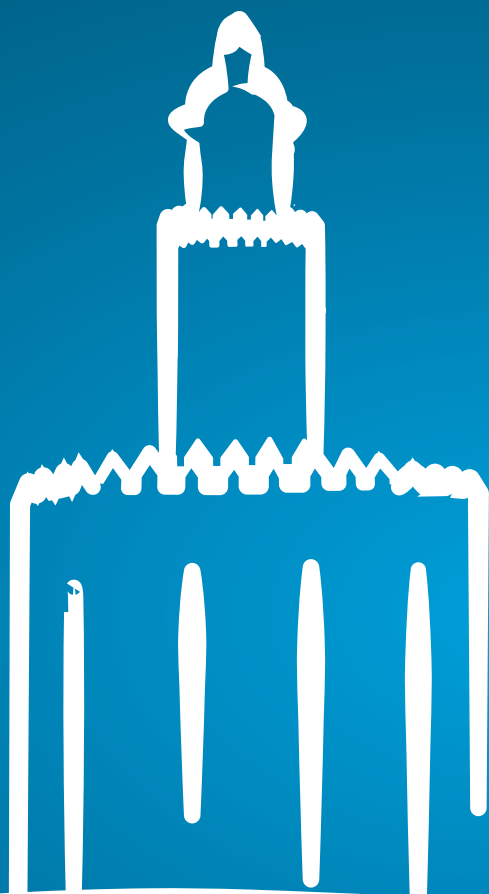
ARTÍCULO I

Impacto del colapso artificial en un programa de vitrificación de blastocistos humanos

ARTÍCULO II

¿Puede la alta magnificación seleccionar espermatozoides genéticamente normales?

20-22
NOVIEMBRE



ASEBIR

VII CONGRESO

SEVILLA 2013

CENTRO DE CONVENCIONES GRAN SEVILLA

SUMARIO

Pág.

EDITORIAL

Becas ASEBIR

Yolanda Mínguez

3

ACTUALIDAD

La batalla por la Especialidad

Manuel Ardoy

5

ARTÍCULOS

Impacto del colapso artificial en un programa de vitrificación de blastocistos humanos

Yosu Franco Iriarte, María José Lázaro Morillo, María Estomba Zubizarreta

8

¿Puede la alta magnificación seleccionar espermatozoides genéticamente normales?

Mónica Dorado Silva, María Hebles Duvisón, Beatriz Migueles Pastor, Mercedes González Martínez, Laura Aguilera Duvisón, Pascual Sánchez Martín, Fernando Sánchez Martín

AULA JOVEN

Multinucleación y desarrollo embrionario

Lucía Hortal, María José de los Santos

23

DEBATE

30

FORMACIÓN CONTINUADA

Implicaciones de la longitud de los telómeros en la biología reproductiva

Mercedes Gallardo

39

AGENDA

46

NOTICIAS

47

INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES

48

Diciembre 2012 Vol. 17 N°2

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 Responsable Certificación ASEBIR y Delegados Autonómicos:

Dra. Carmen Ochoa Marieta

CER. CLINICA COTERO - Santander

Secretaría, Publicaciones:

Dra. Montserrat Boada Palá

INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero

INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

Vocalía de Grupos de Interés, Investigación y Certificación ASEBIR:

Dr. Josep Santaló Pedro

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

Vocalía de Congresos y Certificación ASEBIR:

Dra. Yolanda Mínguez Royo

IVI MADRID - Madrid

Vocalía de Docencia y Formación Continuada:

Dra. Mª José Torello Ybañez

HOSPITAL QUIRÓN, Barcelona

Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel

INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA -IERA -Badajoz

Dr. Juan Manuel Moreno García

CLINICA VISTAHERMOSA, Alicante

Dra. Marga Esbert Algam

IVI BARCELONA, Barcelona

Vocalía Página Web::

Dr. Juan Manuel Moreno García

CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

Vocalía de Publicaciones:

Dr. Jorge Martín Cuadros Fernández

CLÍNICA FIV-MADRID, Madrid

Dra. Marga Esbert Algam

IVI BARCELONA, Barcelona

Dra. Montserrat Boada Palá

INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS, Barcelona

Dr. Josu Franco Iriarte

CENTRO SANITARIO VIRGEN DEL PILAR, San Sebastian

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

Introducing Continuous Single Culture™ (CSC™)

Irvine Scientific® CSC™ is the only true continuous single step culture medium that is clinically proven to improve implantation rates over a sequential media system*

One Step One Choice

- Optimized for use from fertilization through Day 5/6 of development
- Used in a continuous culture system
- Only one medium to order, inventory and store



IZASA

Izasa Distribuciones Técnicas, S.A.
www.izasa.es
consultas: irvine@izasa.es / 902.20.30.90



*Data on file - Shady Grove Fertility Center

*Pending CE Mark

For more information on all our reproductive products visit www.irvinesci.com or call 1-800-437-5706

BECAS ASEBIR

Estimados/as compañeros/as,

Desde Asebir siempre hemos trabajado encarecidamente en potenciar la formación continuada de nuestros socios. Son ya casi 20 años de impartición de cursos/workshops, asistencia a reuniones y publicaciones, en definitiva de labor científica.

Y en ese dinamismo no podemos olvidar que nuestro propio congreso es una actividad formativa de primer orden. El último congreso de Girona todavía lo recordamos como un éxito, con un elevadísimo nivel de participación. No esperamos menos de vosotros en Sevilla 2013.

Sin embargo, y especialmente con el contexto económico actual, somos conscientes de las dificultades de muchos jóvenes para afrontar el esfuerzo económico que implica su asistencia al mismo. Es por ello que pensando en Sevilla 2013, Asebir lanza una iniciativa dirigida a los más jóvenes.

La Junta Directiva ha decidido establecer como ayuda 2 inscripciones gratuitas para la asistencia a nuestro congreso. A esta beca se concursará mediante la contribución a nuestra revista y en concreto al apartado conocido como Aula Joven. Los trabajos recibidos para publicar en Aula Joven en el periodo intercongresos optarán a las ayudas que serán otorgadas a los primeros autores de los dos artículos que finalmente sean seleccionados.

Os animamos a entrar en nuestra web www.asebir.com donde encontraréis toda la información y requisitos para acceder a las becas.

Consideramos que esta iniciativa es una oportunidad muy interesante para jóvenes que se inician en el campo de la Biología de la Reproducción y al mismo tiempo va a contribuir al enriquecimiento científico de nuestra revista y de todos nosotros, como socios de Asebir.

¡Desde aquí invitamos a nuestros jóvenes a que se animen a participar!

Un saludo,

Yolanda Mínguez
Vocalía de Congresos
Junta Directiva de ASEBIR

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



- Incubadores de CO2 y multigas
- Cabinas de flujo laminar
- Sistemas de micromanipulación
- Microscopios y esteromicroscopios
- Sistemas de control de laboratorio
- Y mucho más...



LA BATALLA POR LA ESPECIALIDAD

Manuel Ardoy
e-mail: mardoy@asebir.com

Como sabéis, ASEBIR lleva años luchando sobre la base de la convicción de que el reconocimiento adecuado para nuestro quehacer diario es una Especialidad en Ciencias de la Salud propia para la "Embriología Clínica".

Esto NO nos hace olvidar que hay otros perfiles profesionales en ASEBIR que también precisan un reconocimiento por otras vías y, en este sentido, también estamos trabajando.

En cuanto a la Embriología Clínica, quisiéramos aclarar varios puntos que últimamente han sido objeto de discusión y que consideramos precisan aclaraciones al respecto.

Para ello, es necesario hacer un breve recuerdo histórico:

Desde 1998, ASEBIR defiende su espacio profesional ante la sociedad, la administración y el mundo laboral, definiendo ámbitos formativos, véase la evolución del programa de especialidad de Embriología Clínica o herramientas de reconocimiento de ejercicio profesional, como fue el caso del Certificado de Embriología Clínica que se expedía en colaboración con el COB.

Conscientes de que no era suficiente, se entablaron conversaciones con el Ministerio de Sanidad en las que se abordó desde su inicio la creación de la Especialidad en Embriología Clínica. Como resumen de esta fase inicial podemos decir que el Ministerio consideró desde todo punto de vista inviable una especialidad sola para la embriología clínica. Como justificación, el marco europeo, donde la tendencia era reducir el número de especialidades para apoyar la convergencia de profesionales. Y nos pidieron que buscáramos la posible troncalidad con algunos de los troncos ya existentes.

Como respuesta a la petición del Ministerio, se revisó el programa

de especialidad en Embriología Clínica elaborado por la comisión de especialidad de ASEBIR, se estudiaron los troncos existentes hasta el momento y las especialidades biosanitarias que acogían dichos troncos, teniendo como resultado el actual programa de especialidad que aparece en nuestra web como "propuesta de programa de especialidad en embriología clínica, dentro de la formación troncal de especialidades de la Salud".

Presentada esta modificación en la dirección general de Ordenación y Planificación Sanitaria del Ministerio de Sanidad, y a la espera de que se resolviera el sistema de troncalidades, su director general nos propone la elaboración de un certificado en embriología clínica, dirigido por nuestra sociedad. Reconoce como positiva la existencia de un certificado Europeo, pero insiste en la necesidad de uno Español.

Y nos pusimos a trabajar en el Certificado de Embriología Clínica de ASEBIR, que todos conocéis. La base conceptual estaba clara, el profesional certificado debía ser equivalente en formación al concepto de Especialista en Ciencias de la Salud, con todas las exigencias y limitaciones que esto suponía.

El resultado es por todos conocido. Hasta la fecha, 212 embriólogos han recibido la certificación en "Reproducción Humana Asistida. Embriología Clínica" de ASEBIR. Y es un camino que continúa, tanto para establecer re-acreditaciones como para aquellos post graduados que deseen iniciar "de novo" el estudio de esta especialidad. Esto último estará operativo a lo largo de 2013.

En 2011 comprobamos con estupor que, a pesar de las buenas palabras de los últimos interlocutores Ministeriales, se nos había obviado

en el anteproyecto de Real Decreto que la Sra. Pajín pretendía aprobar, sobre la configuración de los troncos comunes y sobre la creación de nuevas especialidades.

Tras una enérgica queja recibimos un escrito del Ministerio de Sanidad firmado por su subdirector general de Ordenación Profesional, Sr. José Antonio López Blanco, que decía textualmente: "...este departamento sí que ha valorado el ámbito de conocimiento en el que se inserta la Embriología Clínica, que se ha estimado conveniente reconducirlo a especialidades en Ciencias de la Salud fundamentalmente a la de Genética Humana que como ustedes saben también será una especialidad de nueva creación". Y nos emplazaban a una entrevista para hablar de este asunto.

Nuestra sorpresa fue máxima y motivó una reunión inmediata en el Ministerio de Sanidad, en la que se nos reconfirmó dicha opción. **INSISTIMOS EN ESTO, LA OPCIÓN DE ESPECIALIDAD CONJUNTA CON GENÉTICA DENTRO DE LA ESTRUCTURA TRONCAL DE LABORATORIO, FUE UNA PROPUESTA MINISTERIAL.**

Durante la reunión mantenida con el Sr. López Blanco, se le informó sobre la necesidad de pensarlo y comentarlo con los órganos de gobierno de la sociedad. Primero se discutió en la Comisión de Especialidad y después se presentó al total de la junta directiva de ASEBIR, siendo la decisión, aceptar la propuesta Ministerial.

Habíamos valorado pros y contras, oportunidades... y optamos por escuchar la valoración de otras partes. De forma expresa queríamos saber si otras sociedades, entidades... apoyarían esta opción. La respuesta fue unánime: SÍ. Sólo por destacar, expresamente dieron su apoyo:

- La Federación de Asociaciones Médicas de Especialidades (FACME)
- La Unión Interprofesional de la Comunidad de Madrid (UICM), que agrupa a un gran número de colegios profesionales
- Diversos Colegios Médicos territoriales
- El Consejo General de Colegios de Biólogos
- La Presidencia del Consejo General de Especialidades en Ciencias de la Salud (en este caso ha de ser de forma no oficial, pero sí personal)
- Y a destacar, recibió el apoyo unánime de la Comisión de Sanidad del Congreso de Diputados, comisión constituida por representantes de los grupos parlamentarios Izquierda plural, Grupo Mixto, Popular, Socialista, Catalán y Partido Nacionalista Vasco. De ellos surgió la idea de presentar una Proposición no de ley (PNL) con la intención de transmitir al Gobierno su posicionamiento en esta materia. Esta PNL aún no ha sido debatida.

Tras el cambio de Gobierno, ASEBIR volvió a contactar con el nuevo ejecutivo con la intención de conocer qué nivel de

continuidad iban a dar a las decisiones tomadas en la anterior legislatura, asegurándonos que se nos tendría en cuenta en la futura organización del mapa de especialidades.

Después de varias reuniones con el actual Director General de Ordenación Profesional y a pesar de mantener que se nos valoraría, aparece el actual anteproyecto de Real Decreto sin la existencia de la Embriología como especialidad conjunta con genética, como habían dicho previamente y tampoco como especialidad independiente.

En las reuniones posteriores nos comunica el Director General de Ordenación Profesional que nadie le ha pedido que formemos parte del mapa de especialidades. Y nos propone reunirnos con los representantes de genética para valorar si ellos aceptan la especialidad conjunta.

Nuestra sorpresa se expresó ante el representante Ministerial: dado que no había sido una proposición nuestra, pensábamos que no nos correspondía a nosotros comunicar este hecho a los representantes de

genética, era el Ministerio quien tenía que comunicarlo y debería haberlo hecho hacía tiempo.

A pesar de ello y a petición de la Dirección General de Ordenación Profesional, aceptamos reunirnos con la AEGH para valorar la especialidad conjunta, quienes se mostraron radicalmente en contra.

En la última reunión con el ministerio se nos confirma oficialmente que no incluirían en el borrador de esta tanda de nuevas especialidades a la Embriología Clínica, ni como propia ni conjunta con genética, en el sistema troncal.

A lo que sí se compromete el actual ministerio es a valorar la adecuación de la Embriología Clínica tras terminar el actual proceso de remodelación del sistema de especialidades.

Nosotros seguimos trabajando, con más firmeza si cabe, en el reconocimiento de un ejercicio profesional que sin duda redundará en una mejora de la calidad y seguridad asistencial, que al fin y al cabo es lo que mueve nuestra práctica diaria.

Servicios avanzados en **Genética Reproductiva** para su clínica

www.iviomics.com



DGP Anomalías Cromosómicas
DGP Enfermedades Monogénicas
ERA: Endometrial Receptivity Array
Diagnóstico Prenatal
Diagnóstico Molecular Adultos y Niños
Investigación y Desarrollo



iviomics 
PIONEROS EN GENÉTICA REPRODUCTIVA

Contacte con nosotros:
Telf.: 96-3905310 - info@iviomics.com

IMPACTO DEL COLAPSO ARTIFICIAL EN UN PROGRAMA DE VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS HUMANOS

IMPACT OF ARTIFICIAL SHRINKAGE IN A VITRIFIED HUMAN BLASTOCYST

Yosu Franco Iriarte, María José Lázaro Morillo, María Estomba Zubizarreta
 Centro Sanitario Virgen del Pilar. San Sebastián
 e-mail: josufranco@hotmail.es
 Fecha recepción: 30 Septiembre 2012
 Fecha aceptación: 17 Octubre 2012

RESUMEN

Los avances en los sistemas de cultivo con medios secuenciales han hecho posible el desarrollo de embriones humanos hasta el estadio de blastocisto. Como consecuencia, la necesidad de criopreservar blastocistos humanos se ha incrementado. Los blastocistos expandidos son probablemente más sensibles a la criopreservación que los blastocistos tempranos debido a que la formación de cristales de hielo puede ocurrir en la cavidad del blastocele por una insuficiente deshidratación. El colapso artificial es un procedimiento mediante el cual se reduce el volumen del blastocisto incrementando el porcentaje de supervivencia. El objetivo del estudio fue analizar el uso de la técnica del colapso en nuestro programa de vitrificación de blastocistos. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 8-15.

Palabras clave: blastocisto, colapso, vitrificación, masa celular interna, trofoectodermo.

SUMMARY

Recent advances in culture systems with sequential media have made it possible to develop human IVF embryos into blastocyst quite easily. As a result, the need to cryopreserve human blastocyst has increased. Expanded human blastocysts are probably more sensitive to cryopreservation than early blastocysts as a consequence of detrimental ice crystals formation may occur in the blastocoelic cavity due to insufficient dehydration. The artificial shrinkage is a procedure that reduces the blastocyst's volume increasing the survival rate. The aim of this study was to analyze the use of artificial shrinkage in our blastocyst vitrified programme. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 8-15.

Key words: blastocyst, shrinkage, vitrification, inner cell mass, trophoectoderm.

INTRODUCCIÓN

El avance producido en los sistemas de cultivo durante los últimos años, ha favorecido la obtención de un mayor número de embriones que se desarrollan hasta el estadio de blastocisto (D+5 y D+6), los cuales tienen un mayor poder de implantación (Gardner et al., 1997).

Estudios randomizados muestran que entre el 28 y el 55% de los embriones que se obtienen en el laboratorio evolucionan hasta

estadio de blastocisto (Papanikolaou et al., 2008) gracias al uso de estos medios secuenciales. Sin embargo, la capacidad de los embriones de continuar su desarrollo hasta D+5/D+6 puede oscilar entre un 0 y un 100% en cada paciente.

Este cultivo prolongado permitiría la selección y transferencia de un único blastocisto, reduciendo las tasas de embarazo múltiple asociadas con las técnicas de reproducción asistida (Guerif et al., 2009). De esta forma, surge la necesidad de criopreservar

los blastocistos supernumerarios obtenidos en el laboratorio.

La congelación lenta ha sido el método elegido durante mucho tiempo, pero a día de hoy la vitrificación es el principal método de criopreservación utilizado para blastocistos, siendo la formación de cristales de hielo el mayor riesgo en ambos procedimientos.

Desde el primer nacimiento obtenido tras la vitrificación de un blastocisto humano utilizando pajuelas de congelación (Yokota et al., 2000), la

atención se ha focalizado en utilizar pequeños volúmenes de crioprotector para evitar en mayor medida sus efectos tóxicos. Esta eficacia se demuestra por los porcentajes de supervivencia obtenidos en blastocistos tempranos usando cryotop (Kuwayama et al., 2000), cryoloop (Mukaida et al., 2001, 2003; Read et al., 2002), redes de microscopía electrónica o celdas (Choi et al., 2000; Son et al., 2003) y pajuelas de congelación (Vanderzwalmen et al., 2003).

Sin embargo, los blastocistos expandidos muestran un porcentaje de supervivencia menor después de la vitrificación (Cho et al., 2002), debido a la existencia de un mayor volumen de líquido que en los blastocistos tempranos, de manera que aumenta el riesgo de formación de cristales de hielo durante el proceso de enfriamiento.

Durante el desarrollo embrionario, el blastocisto experimenta numerosos cambios morfológicos. Al expandirse, se acumula en el blastocele una concentración mayor de Na^+ y K^+ , provocando una presión, no solo en la zona pelúcida, sino también en el trofoectodermo. Al mismo tiempo, el trofoectodermo libera lisinas implicadas en el adelgazamiento de la zona pelúcida, en concordancia con los ciclos de contracción y expansión del blastocisto.

El razonamiento del colapso artificial está basado en estos ciclos de expansión y contracción y extensión citoplasmática del trofoectodermo. Esta técnica es usada y considerada como un paso esencial para mejorar la eficacia de la vitrificación para el estadio de blastocisto.

Varios estudios han observado un incremento en la tasa de supervivencia de blastocistos cuando el volumen del blastocele había sido reducido artificialmente (Vanderzwalmen et al., 2003; Son et al., 2003; Hiraoka et al., 2004; Mukaida et al., 2006).

La ventaja del colapso es que aumenta la eficiencia del protocolo de vitrificación en cuanto a la reducción de la formación de cristales de hielo

por la disminución del contenido hídrico presente en el blastocele.

El objetivo de nuestro estudio fue determinar el impacto del colapso en nuestro programa de vitrificación de blastocistos mediante una aguja de microinyección y determinar la seguridad de este procedimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado entre febrero de 2010 y agosto de 2012, incluyendo en este periodo pacientes sometidas a tratamientos de FIV cuyos embriones sobrantes habían dado lugar a blastocistos expandidos en D+5 o D+6 siendo vitrificados aquellos de calidad óptima (3-4 de expansión, y en cuanto a trofoectodermo y MCI, las combinaciones A/A, A/B, B/B, A/C, B/C, según la clasificación de Gardner).

Como grupo control incluimos pacientes con blastocistos expandidos en D+5 o D+6 a los cuales no se les realizó colapso previo a la vitrificación.

En el grupo de estudio se incluyeron aquellas pacientes con blastocistos expandidos en D+5 o D+6 a las cuales se les realizó el colapso previo a la vitrificación.

Las pacientes fueron tratadas con agonistas de la GnRH, según protocolo corto o largo de estimulación, y posterior administración de hCG, cuando los folículos poseían un diámetro de 17 mm. Los ovocitos fueron recuperados entre 36 y 38 horas posadministración de hCG, mediante punción folicular transvaginal ecoguiada.

Los ovocitos recuperados fueron cultivados en IVF Plus de Vitrolife a 37°C y un 6% de CO_2 , durante 2 horas. En ese momento, se realizó la decumulación enzimática y mecánica de los mismos. Durante la fase enzimática, los ovocitos fueron transferidos a la hialuronidasa de Vitrolife, Hyase™-10X, subiéndolos y bajándolos con una pipeta Pasteur de vidrio. Posteriormente, los ovocitos fueron lavados en un medio tamponado, Gamete de Vitrolife, y son decumulados mecánicamente utilizando una Stripper de 130 μm .

Una vez retiradas las células del cúmulo, se clasificaron y separaron los ovocitos según su estadio de madurez (metafase II, metafase I o profase I), y se cultivaron durante 2-3 horas en las mismas condiciones previas a la decumulación.

Durante ese tiempo, las muestras seminales que iban a ser utilizadas para la fecundación, fueron procesadas mediante *swim-up*.

A las 2-3 horas posdecumulación, los ovocitos fueron fecundados mediante microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Tras realizar la ICSI, los ovocitos fueron cultivados hasta el día siguiente en IVF plus de Vitrolife en condiciones atmosféricas de 37°C y 6% de CO_2 .

CULTIVO EMBRIONARIO

La fecundación fue valorada entre 16 y 19 horas posmicroinyección, por la presencia de 2 pronúcleos, siguiendo la clasificación de Scott (2000) (Figura 1), así como la observación del número y apariencia de corpúsculos polares y la presencia de halo citoplasmático.

En ese momento, los cigotos fueron transferidos a medio G1 Plus de Vitrolife donde fueron cultivados durante 48-72 horas. Todo el cultivo fue realizado en una atmósfera de CO_2 al 6%.

En D+3, fueron transferidos a las pacientes uno o dos preembriones de calidad A y/o B según la clasificación embrionaria de ASEBIR.

Los preembriones supernumerarios fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto en medio G2 Plus (Vitrolife Serie G™, Sweden) realizando el cultivo en una atmósfera de triple gas (6% CO_2 , 5% O_2 y 89% N_2).

En D+5 los blastocistos desarrollados fueron examinados, clasificando cada blastocisto según el criterio de calidad de Gardner y colaboradores (Gardner et al., 2000). Los blastocistos fueron clasificados teniendo en cuenta su apariencia morfológica, atendiendo inicialmente a su grado de expansión

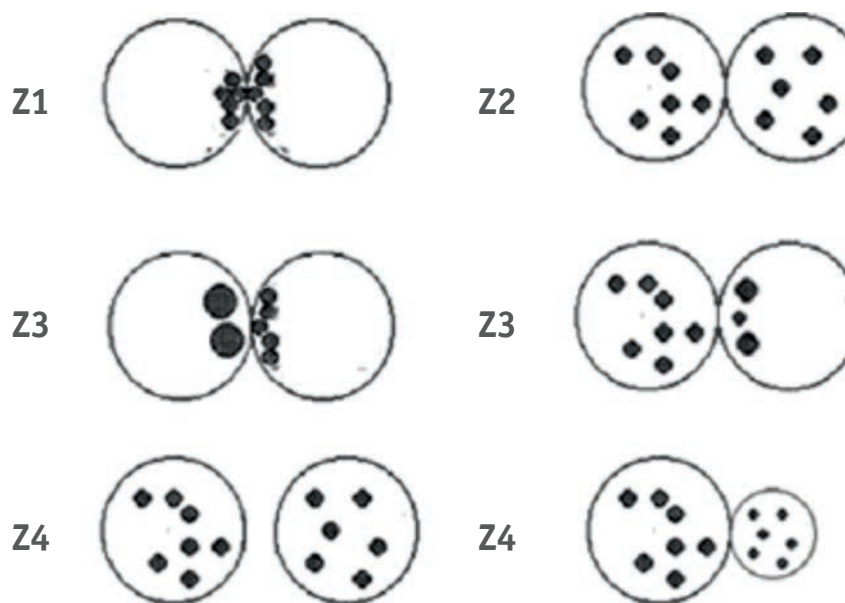


Figura 1. Esquema de clasificación pronuclear propuesta por Scott (2000).

del 1 al 6. Seguidamente, se evaluó la masa celular interna (MCI) clasificándola como A (muchas células fuertemente empaquetadas), B (varios grupos de células ligeramente empaquetadas), C (pocas células) y D (ausencia de masa).

El trofoectodermo fue clasificado como A (muchas células formando un epitelio cohesivo), B (varias células formando epitelio), C (pocas células) y D (ausencia celular).

Tras valorar el estadio de desarrollo y calidad del blastocisto, se vitrificaron aquellos embriones clasificados como A o B.

Si los blastocistos eran clasificados como C a nivel del trofoectodermo o MCI, también eran vitrificados, descartando la criopreservación en aquellos embriones que tanto en la MCI como en el trofoectodermo mostraban una clasificación tipo C o D.

COLAPSO ARTIFICIAL DE BLASTOCISTOS EXPANDIDOS

La técnica del colapso utilizando una aguja de microinyección fue descrita previamente por Vanderzwalmen et al. (2002).

Previamente a la vitrificación, los blastocistos expandidos fueron colocados en microgotas de 50 µl del medio para blastocistos (Vitrolife Serie G™, Sweden).

Mediante una pipeta de sujeción colocada en un sistema de micromanipulación, la MCI es posicionada a las 6 o las 12, introduciendo la aguja entre la unión de dos células del trofoectodermo. Las uniones celulares pueden reparar el orificio realizado, por este motivo es importante mover la aguja varias veces consecutivas con el fin de establecer una buena rotura entre las células (Figura 2).

Una vez realizada la técnica, observamos la contracción del blastocisto, momento adecuado para vitricular el blastocisto y almacenarlo en el tanque de nitrógeno líquido.

VITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS

Los blastocistos colapsados y no colapsados fueron vitrificados utilizando como soporte de vitrificación el cryotop (Kitazato BioPharma Co., Shizuoke Japan) y como medios de vitrificación, Vitrication Freeze Kit (Vit Kit

® - Freeze) de Irvine Scientific, California, USA.

En cada cryotop, los blastocistos fueron vitrificados de manera individual o de dos en dos.

Previo al inicio del proceso de vitrificación, los medios fueron atemperados durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Los blastocistos seleccionados para vitricular fueron colocados en el medio de equilibrado (ES) a temperatura ambiente.

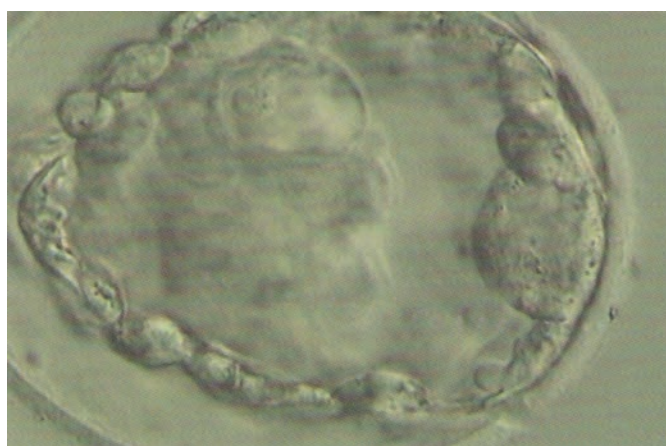
El tiempo de exposición al medio ES dependerá de si el blastocisto está colapsado o no. Si se realizó colapso, el tiempo de exposición fue de 8 minutos; sin colapso el tiempo aumenta hasta 15 minutos.

Después de ese tiempo, transferimos los blastocistos a una gota del medio de vitrificación (VS), en la que los lavamos para eliminar los restos de medio ES, y los cargamos en el soporte de vitrificación con el menor volumen de medio posible.

Retiramos el exceso de medio existente entorno a los blastocistos,



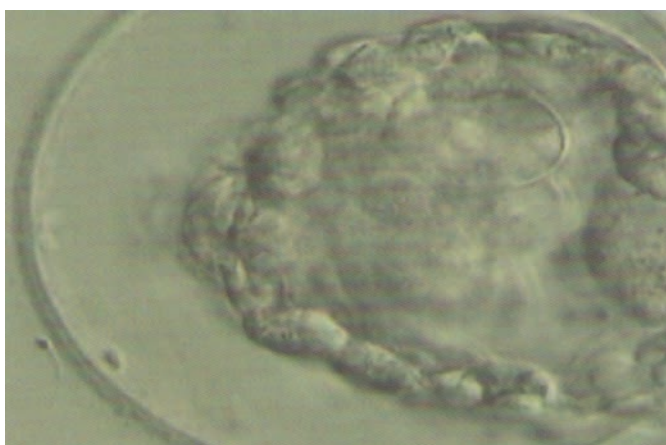
A1



A2



B1



B2



C1



C2

Figura 2. Colapso artificial de blastocistos expandidos con una aguja de microinyección.
 (A1) Blastocisto expandido conectado a una micropipeta de sujeción e inserción de una micropipeta de ICSI.
 (B1, C1) Movimiento continuo de la aguja de microinyección entre dos células.
 (A2) Comienzo de contracción del blastocele.
 (B2) Contracción parcial del blastocele.
 (C2) Contracción completa del blastocele.

y sumergimos el cryotop rápidamente en el nitrógeno líquido. Este último paso debe llevarse a cabo en un máximo de tiempo de 90 segundos.

Los blastocistos vitrificados fueron almacenados en el banco de embriones hasta que la paciente lo requiera.

DESVITRIFICACIÓN DE BLASTOCISTOS

Al igual que en el proceso anterior, los medios fueron atemperados previo al inicio de la desvitrificación.

Los cryotop con los blastocistos que se van a desvitrificar son transferidos a un recipiente de menor tamaño con nitrógeno líquido, que colocaremos al lado de la lupa.

Retiramos la cubierta de plástico del cryotop, sin que la zona donde están colocados los blastocistos salga fuera del nitrógeno líquido; rápidamente introducimos y agitamos la lengüeta del cryotop con los blastocistos en el medio de desvitrificación (TS) durante 1 minuto.

Después transferimos los blastocistos a las gotas de medio de dilución (DS), dejándolos durante 2 minutos en cada una de las dos gotas.

Finalmente, se eliminan los restos de crioprotector al transferir los blastocistos a las 3 gotas de medio de lavado (WS), manteniéndolos 3 minutos en cada una de ellas.

Los blastocistos desvitrificados fueron cultivados en microgotas de medio G2 Plus Vitrolife Serie GTM, Sweden, de 2 a 4 horas en ambiente de triple gas (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂).

La supervivencia de los blastocistos fue determinada por la presencia de cavidad blastocélica 2 horas después del cultivo in vitro y fueron transferidos al útero de las pacientes 4 horas posdesvitrificación.

Se administró progesterona por vía vaginal (600 mg/día), así como 6 comprimidos al día de Progynova (Bayer Hispania, S.L.) para mantener la fase lútea.

El resultado de embarazo fue confirmado 11 días más tarde mediante la determinación en suero de la fracción beta de la hCG.

ESTADÍSTICA

Los datos fueron analizados mediante el análisis de χ^2 para determinar las

diferencias existentes en el porcentaje de supervivencia, implantación y embarazo.

Para ello fue utilizado el programa SPSS para Windows, considerando como significación estadística un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

En nuestro laboratorio hemos estudiado el impacto del colapso artificial en blastocistos expandidos en D+5 y D+6 previo a la vitrificación de los mismos.

La tabla I resume las características de las pacientes y el porcentaje de supervivencia y embarazo de blastocistos humanos vitrificados con colapso (grupo de estudio) o sin colapso (grupo control).

Como grupo control, hemos realizado 49 ciclos de desvitrificación en los que hemos desvitrificado un total de 75 blastocistos no colapsados, de los que sobrevivieron 58 (77%). En este grupo, fueron canceladas 9 transferencias por no supervivencia.

En nuestro grupo de estudio hemos incluido 36 ciclos de desvitrificación

	Grupo Estudio	Grupo control
Nº de ciclos	36	49
Edad	37,2	36,8
Nº de ciclos cancelados debido a la no supervivencia	1	9
Nº de blastos desvitrificados	52	75
Nº de blastos que sobreviven	51	58
Media de blastos transferidos	1,46	1,44

Tabla I. Características de pacientes y supervivencia de blastocistos humanos vitrificados con (grupo estudio) y sin (grupo control) colapso artificial.

en los que fueron desvitrificados un total de 52 blastocistos colapsados, de los cuales sobrevivieron 51 (98,1%). En este caso, tan solo se canceló 1 transferencia.

La tabla 2 resume los resultados obtenidos con y sin colapso artificial previo a la vitrificación.

La tasa de supervivencia entre ambos grupos muestra diferencias estadísticamente significativas a favor del colapso artificial previo a la vitrificación ($p < 0,005$).

En el grupo control, la tasa de implantación obtenida fue un 32,7%, mientras que en el grupo de estudio fue un 29,4%, siendo estas diferencias no significativas ($p > 0,05$).

En cuanto a las tasas de embarazo, los resultados fueron similares entre ambos grupos; 50% en el grupo control y 51% en el grupo de estudio, no encontrando diferencias significativas ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Tradicionalmente muchas de las unidades de Reproducción Asistida realizan la transferencia de preembriones humanos en D+3. Al mismo tiempo, la mentalidad de las unidades de reproducción ha ido cambiando, cultivando cada vez más preembriones hasta estadio de blastocisto con la intención de poder seleccionar un único embrión de

calidad óptima. Este hecho genera un mayor número de embriones sobrantes en estadio de blastocisto disponibles para la congelación.

Varios estudios de experimentación animal han evaluado el estadio de desarrollo con respecto a la supervivencia embrionaria durante la criopreservación.

Hochi y colaboradores confirmaron la influencia del volumen embrionario en relación a la supervivencia de blastocistos equinos tras descongelación. Los blastocistos de diferentes tamaños $<200\mu\text{m}$ (blastocisto temprano), $200-300\mu\text{m}$ (blastocisto parcialmente expandido) y mayor de $300\mu\text{m}$ (blastocisto haciendo eclosión) obtienen un grado de supervivencia mayor cuando el volumen del blastocisto a la hora de la vitrificación es menor.

Un estudio realizado por Zhou y colaboradores (2005) también confirmó que el mejor estadio para vitrificar un blastocisto era el que correspondía al blastocisto con menor volumen.

Los diferentes estadios de maduración del blastocisto tienen un impacto en el éxito de la vitrificación. El blastocisto con una pequeña cavidad blastocélica y no expandido difiere estructuralmente del blastocisto expandido. Un blastocisto expandido contiene un gran volumen de líquido, lo que provoca un mayor tiempo de

exposición a los crioprotectores y un mayor riesgo de formación de cristales de hielo. Por este motivo, tal y como se recoge en varios estudios de animales y humanos, la utilización de un procedimiento adicional de reducción artificial previo a la vitrificación evitaría este problema. (Chen Su et al., 2005; Vanderzwalmen et al., 2002; Mukaida et al., 2003).

Nuestro estudio sugiere que la utilización del colapso en blastocistos expandidos previo a la vitrificación mejora la tasa de supervivencia reduciendo de esta forma la tasa de cancelación.

Han sido evaluados un total de 85 ciclos de blastocistos vitrificados, de los cuales, a 36 ciclos se les aplicó la técnica del colapso artificial, con un porcentaje de supervivencia del 98,1%. Este resultado demuestra que el colapso de blastocistos expandidos puede ayudar a mejorar los resultados obtenidos en un programa de vitrificación.

Esta observación concuerda con el estudio realizado por Vanderzwalmen y colaboradores (2002), donde la eficiencia de la vitrificación de blastocistos humanos estuvo correlacionada negativamente con el grado de expansión del blastocelo.

En nuestro estudio, el porcentaje de supervivencia en blastocistos no colapsados fue claramente inferior (77%). Esta diferencia

	COLAPSO	NO COLAPSO
TASA DE SUPERVIVENCIA	51/52 (98,1%)	58/75 (77%)
TASA DE CANCELACIÓN	1/36 (2,8%)	9/49 (18,4%)
TASA DE IMPLANTACIÓN	15/51 (29,4%)	19/58 (32,7%)
TASA DE EMBARAZO β -hCG +	18/35 (51%)	20/40 (50%)

Tabla II. Tasa de embarazo obtenida entre el grupo control (sin colapsar) y grupo de estudio (colapsado).

puede ser debida a una inapropiada deshidratación y permeabilización del crioprotector.

Varios autores han publicado que el daño mecánico causado por la formación de cristales de hielo debería ser evitado reduciendo el contenido hídrico del blastocele, utilizando para ello distinta metodología: agujas de microinyección (Son, 2003; Vanderzwalmen, 2002), utilización de una pipeta de diámetro menor (Hiraoka, 2004) y mediante el uso del láser (Hiraoka, 2008; Mukaida, 2006). En todos estos trabajos se recoge una mejora en el porcentaje de supervivencia tras realizar el colapso.

En cuanto a las tasas de implantación y de embarazo, no observamos diferencias significativas entre ambos grupos, resultado que puede ser debido al pequeño tamaño muestral del estudio.

En conclusión, este estudio confirma la seguridad de la técnica del colapso previo a la vitrificación de blastocistos, y puede ser utilizada como método adicional para mejorar la eficiencia de la vitrificación de blastocistos en nuestros laboratorios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2002;17:2419-2422.
- Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertil Steril* 2000; 74:838-839.
- Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3:367-382.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Zchoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73:1155-1158.
- Glass RH, Lin TP, Florence J. Mouse blastocyst re-expansion following puncture and treatment with inhibitors. *J Reprod Fertil* 1973; 35:533-536.
- Gonzales DS, Bavister BD. Zona pellucida escape by hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vivo. *Biol Reprod* 1995; 52:470-480.
- Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O, Sausseureau M, Cadoret V, Jamet C, Royere D. Single day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod* 2009; 24:1051-1058.
- 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* 2004; 19:2884-2888.
- Hiraoka K, Fuchiwaki M, Hiraoka K, Horiuchi T, Murakami T, Kinutani M, et al. Effect of the size of zona pellucida opening by laser assisted hatching on clinical outcome of frozen cleaved embryos that were cultured to blastocyst after thawing in women with multiple implantation failures of embryo transfer: a retrospective study. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25:129-135.
- Hochi S, Ogasawara M, Braun J, Oguri N. Influence of relative embryonic volumes during glycerolequilibration on the survival of frozen-thawed equine blastocysts. *J Reprod Dev* 1994; 40:243-249.
- Hur YS, Park JH, Ryu EK, Yoon HJ, Yoon SH, Hur CY, et al. Effect of artificial shrinkage on clinical outcome in fresh blastocyst transfer cycles. *Clin Exp Reprod Med* 2011; 38:87.
- Kader AA, Choi A, Orief Y, Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:99.
- Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17:477.
- Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yauger BJ, FW. Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2008; 90:2138-2143.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 2001; 76:618-620.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003; 18:384-391.
- Mukaida T, Takahashi K, Goto T, Oka C. Artificial shrinkage of blastocoele using either micro-needle or laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2006; 21:3246-3252.

Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008; 23:91–99.

Reed ML, Lane M, Gardner DK, et al. Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19:304–306.

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; 18:137-139.

Thum MY, Wells V, Abdalla H. Patient selection criteria for blastocyst culture in IVF/ICSI treatment. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27:555-560.

Vanderzwalm 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 blastocoelic cavity before vitrification, *Hum Reprod* 2002; 17:744-751.

Vanderzwalm P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, Bollen N, van Roosendaal E,

et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing, *Hum Reprod* 2003; 18:1504-1511.

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, et al. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod* 2000; 15:1802–1803.

Zhou GB, Zhu SE, Hou YP, Jin F, Yang QE, Quan GB, et al. Vitrification of Mouse embryos at various stages by open-pulled straw (OPS) method. *Anim Biotechnol* 2005; 16:153-63.

IVF Incubator G-185



Sistema de almacenamiento G-185



- » Optimiza la utilización del espacio
- » Hasta 3 unidades por armario
- » Fluidez en el trabajo

Cámaras independientes de cultivo



- » Diseñado para ART
- » Calor directo a la placa
- » 1 cámara acoge hasta 4 placas



RI Witness™



Pantalla táctil de captura de datos



- » Introducción directa de los datos del paciente desde la estación de trabajo
- » Evita la manipulación continua de datos y errores de transcripción
- » Permite el acceso inmediato a los datos

Lector por radiofrecuencia



- » Identificación automática de la identidad con etiquetas adhesivas RFID
- » Mejora el registro y control del flujo de trabajo
- » Incrementa la seguridad

¿PUEDE LA ALTA MAGNIFICACIÓN SELECCIONAR ESPERMATOZOIDES GENÉTICAMENTE NORMALES?

CAN INTRA-CYTOPLASMIC MORPHOLOGICALLY- SELECTED-SPERM-INJECTION (IMSI) SELECT GENETICALLY NORMAL SPERMATOZOA?

²Mónica Dorado Silva, ¹María Hebles Duvisón, ²Beatriz Migueles Pastor, ²Mercedes González Martínez, ²Laura Aguilera Duvisón, ¹Pascual Sánchez Martín, ¹Fernando Sánchez Martín

¹Clínica Ginemed .Sevilla, ²Fundación Ginemed. Sevilla

e-mail: mdorado@ginemed.es

Fecha recepción: 3 Febrero 2012

Fecha aceptación: 19 Octubre 2012

RESUMEN

La selección de espermatozoides en un microscopio convencional para microinyección intracitoplasmática (ICSI) está basada en la valoración morfológica del espermatozoide a 400 aumentos ópticos. El estudio espermático, debido al reducido tamaño de dichos gametos, queda muy limitado, pudiendo seleccionar espermatozoides que parecen tener buena morfología con otro tipo de alteraciones. El microscopio de alta magnificación permite observarlos y seleccionarlos a 1600 aumentos ópticos, consiguiendo de esta manera estudiarlos más profundamente, pudiendo descartar aquellos con anomalías no detectables a menos aumentos. Habitualmente las muestras de los pacientes son estudiadas a partir de una parte de la misma, extrapolando así el resultado al resto de espermatozoides no estudiados y considerando que se comportarán de igual manera.

La alta magnificación nos permite, entre otras cosas, hacer un estudio morfológico y seleccionar espermatozoides, ya sea para realizar la microinyección o para realizar pruebas adicionales.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la eficacia de la alta magnificación para seleccionar espermatozoides genéticamente normales. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 18-21.

Palabras clave: FISH en espermatozoides, alta magnificación, aneuploidías en espermatozoides.

SUMMARY

The selection of spermatozoa under a conventional microscope for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is based on the sperm morphological evaluation at 400x magnifications. Due to the reduced size of the aforementioned gametes, the sperm study is very limited as it allows selecting spermatozoa with an apparently good morphology but that may have any kind of abnormalities. The high magnification microscope allows observing and selecting spermatozoa at 1600x magnifications so a deeper study can be done and those spermatozoa with abnormalities that are not detectable at low magnifications can be rejected.

Usually only a part of the patient's semen sample is studied and the results are extrapolated to the rest of non-studied spermatozoa considering that they may have a similar behaviour.

High magnification allows us, among others, carrying out a morphological study and selecting spermatozoa for both microinjection and any additional tests.

The aim of our study was to evaluate the efficiency of high magnification for the selection of genetically normal spermatozoa. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 18-21.

Key words: FISH in spermatozoa, high magnification, aneuploidies in spermatozoa.

INTRODUCCIÓN

La selección de espermatozoides en un microscopio convencional para microinyección intracitoplasmática (ICSI) está basada en la valoración morfológica del espermatozoide a 400 aumentos ópticos. Esto nos permite detectar alteraciones severas en los espermatozoides reconocidas en el análisis convencional del semen (de

Almeida Ferreira Braga et al., 2011). No obstante, esta técnica presenta limitaciones porque solo permite observar grandes alteraciones pasando desapercibidas las de menor escala (Berkovitz et al., 1999).

La imagen que obtenemos de los espermatozoides a alta magnificación permite observar anomalías estructurales indetectables a los

aumentos convencionales (Bartoov, et al., 2001), lo que permite seleccionar espermatozoides con mejor morfología. Es por ello por lo que algunos autores han demostrado que la selección de espermatozoides con microscopio de alta magnificación (1600 aumentos ópticos) mejora los resultados de la ICSI, sobre todo en aquellos casos en los que existe daño testicular (Garolla et al., 2008).

Habitualmente las muestras de los pacientes son estudiadas a partir de una parte de la muestra extrapolando así el resultado al resto de espermatozoides no estudiados y considerando que se comportarán de igual manera. De esta manera, si queríamos observar la morfología y porcentaje de aneuploidías que presentaba una muestra, se estudiaban ambos parámetros por separado. La alta magnificación nos permite, entre otras cosas, hacer un estudio morfológico a 6000x y seleccionar a su vez los espermatozoides que queramos, ya sea para hacer pruebas adicionales, por ejemplo estudio de aneuploidías, como para microinyectar con los de mejor morfología.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la eficacia de la alta magnificación para seleccionar espermatozoides genéticamente normales a partir de la morfología observada a dichos aumentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para el presente estudio se utilizaron muestras seminales de 10 pacientes que acudieron a la Clínica en los últimos 6 meses del año 2010. De cada muestra se seleccionaron espermatozoides de los distintos grupos a estudiar. Como grupo control se utilizaron los espermatozoides morfológicamente normales de un donante.

Las muestras de semen usadas para la selección se prepararon por gradiente de densidad en capas de 0,3 a 1 mL de 40% y de 0,3 a 1 mL de 80% de Sperm Grad (Vitrolife®) y Ham F-10 (Gibco) con gentamicina. La centrifugación se llevó a cabo a 300 g por 20 minutos seguida de un lavado a 400g por 10 minutos en medio tamponado: Quinn's Advantage Medium with HEPES de SAGE (HTF).

Los espermatozoides fueron depositados en una placa de microinyección específica (WillCo-Dish®) para el microscopio de alta magnificación en gotas de Polivinil Pirrolidona (PVP, 7% Solution, SAGE). Tras la selección de los mismos, fueron depositados en gotas de medio tamponado HTF.

SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides fueron observados y captados uno a uno con el sistema de micromanipulación CellTram Oil, eppendorf acoplado a un microscopio de alta magnificación, LEICA CTR 6000 y depositados en un portaobjeto para su posterior análisis en cuatro grupos: grupo 1 (espermatozoides con cabezas grandes), grupo 2 (espermatozoides con cabezas elongadas), grupo 3 (espermatozoides con cabezas normales y grandes vacuolas) y grupo control (espermatozoides con cabeza normal sin vacuolas).

Para cada grupo se seleccionaron un total de 15 espermatozoides de los pacientes. Para el grupo control también se seleccionaron 15 espermatozoides.

FIJACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Cada espermatozoide fue colocado en una parte específica del portaobjeto en 1µl de HTF y fijado con Carnoy posteriormente. El proceso se repitió para cada uno de los espermatozoides seleccionados obteniendo poblaciones de espermatozoides para cada grupo estudio.

PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES PARA FISH

Antes de la hibridación los portaobjetos con los espermatozoides fijados eran lavados en 2X citrato sódico salino (SSC) durante 5 minutos, deshidratados en etanol (70/90/100%) y descondensación con ditiotreitól (DTT) durante 30 minutos a 37°C.

HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

Se utilizaron las sondas comerciales del kit Aneuvysion™ (Vysis) con las pruebas específicas para el cromosoma 18 (CEP 18 spectrumAqua™ 18p11-1-q11.1), para el cromosoma X (CEP X spectrumGreen™ Xp11-1-q11.1) y para el cromosoma Y (CEP Y SpectrumOrange™ Yp11.1-q11.1) para detectar el número de copias que existen para cada uno de los cromosomas.

La desnaturalización se realizó a 74°C durante 4 minutos y las sondas se dejaron al menos 16 horas a 37°C. Después de la hibridación los portas fueron lavados en 0.4x SSC, 0.3% de Nonidet P40 (NP40) a 71°C durante 2 minutos, seguido de 10 segundos en 2.0x SSC 0.1% NP40 a temperatura ambiente. Una vez secos eran cubiertos con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, Sigma) (Petit et al., 2005).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

El estudio estadístico se realizó aplicando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, con el programa estadístico SPSS v.17.

RESULTADOS

El FISH de espermatozoides realizado reveló la presencia de alteraciones en todos los grupos estudiados (Tabla I). En el grupo de espermatozoides con cabeza grande encontramos mayor porcentaje de espermatozoides con carga genética diploide que en los otros grupos, aunque también observamos

Tabla I: Alteraciones cromosómicas en los distintos grupos estudiados

	Grupo control	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	p
Haploide	13	9	10	12	NS
% Haploides	86%	60%	66%	80%	
Disómicos	1	3	3	2	NS
% Disómicos	7%	20%	20%	14%	
Diploides	1	3	2	1	NS
% Diploides	7%	20%	14%	6%	

Grupo 1: Espermatozoides macrocéfalos, Grupo 2: Espermatozoides con cabezas elongadas, Grupo 3: con morfología normal y grandes vacuolas

la presencia de espermatozoides con disomías y con carga genética normal. El grupo de espermatozoides con cabezas elongadas mostraron espermatozoides con disomías en un número superior al que presentaba el grupo control, no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos.

En los grupos de espermatozoides morfológicamente normales, tanto en el grupo control como en el que portaban vacuolas, el número de alteraciones genéticas era menor que en los otros grupos, no obteniendo tampoco diferencias significativas. En la figura 1 se muestran algunos ejemplos de espermatozoides con estas características.

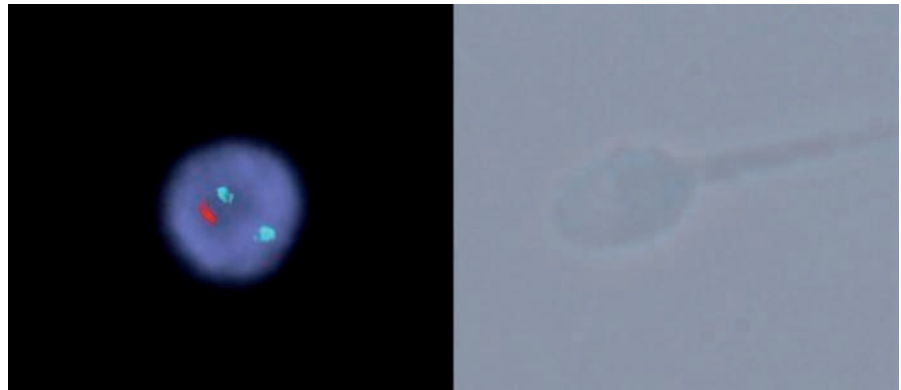
DISCUSIÓN

El presente estudio reveló la existencia de alteraciones genéticas en todos los grupos estudiados. Devillard (2002) observó que los espermatozoides con cabezas grandes presentan un porcentaje mayor de alteraciones genéticas que aquellos que presentan un tamaño menor, hecho que concuerda con nuestros resultados. Prinsant (2007) en su estudio con pacientes que presentaban un porcentaje alto de espermatozoides con cabezas elongadas, realizaron un análisis estructural y genético, observando mayor número de alteraciones en el grupo de cabezas elongadas comparado con el grupo control.

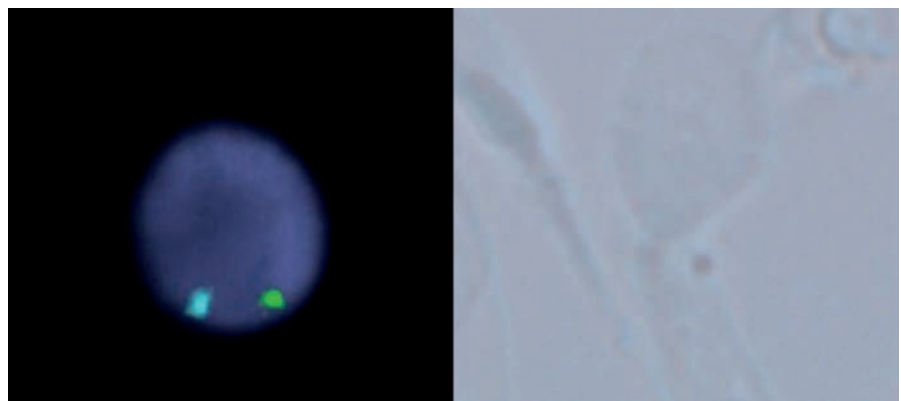
En nuestro grupo control, espermatozoides de donante con cabezas normales, encontramos mayoritariamente carga genética normal para los cromosomas estudiados. Con respecto al grupo de cabezas normales pero con vacuolas, principalmente presentaron una dotación normal aunque el porcentaje de aneuploidías era superior al del grupo control.

Garolla et al. (2008) realizaron un estudio completo de espermatozoides que incluyó función mitocondrial, integridad del DNA espermático, fragmentación y aneuploidías. Encontraron mayor daño en muestras con daño testicular que en el grupo

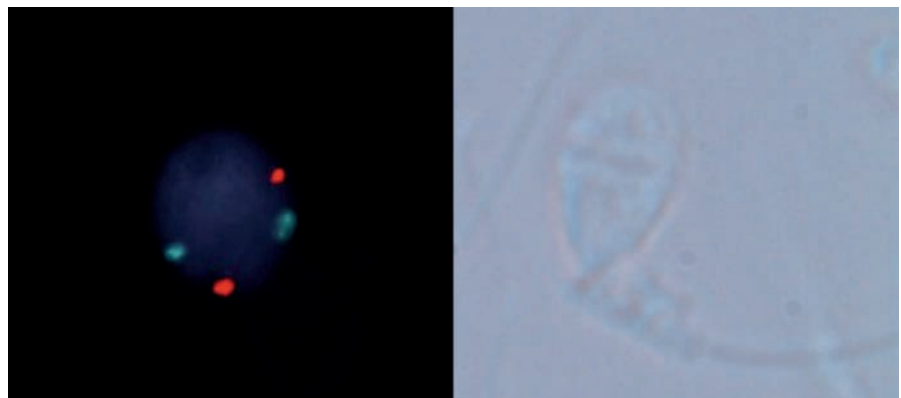
Figura 1.



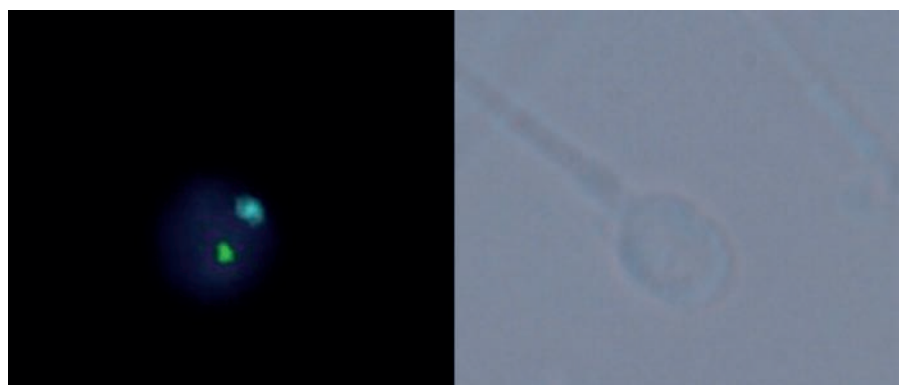
Espermatozoide normal disómico



Espermatozoide macrocéfalo haploide



Espermatozoide macrocéfalo diploide



Espermatozoide normal haploide (grupo control)

control o incluso aquellos que presentaban obstrucción parcial. Con respecto a las vacuolas, ellos encontraron aneuploidías en esos espermatozoides a pesar de tener cabeza normal, no observándolas en el grupo control con cabeza normal sin vacuolas.

De Almeida Ferreira Braga et al. (2011), encontraron una relación entre la fragmentación del DNA y la presencia de vacuolas, pero no encontraron correlación entre aneuploidías y alta magnificación.

Dado que nuestro estudio mostró presencia de alteraciones en todos los grupos estudiados, podemos pensar que el tamaño y la forma de la cabeza no son condición suficiente para asegurar la carga genética del espermatozoide, y por tanto la alta magnificación no nos sería útil para asegurarnos espermatozoides genéticamente normales. A pesar de ello, esta herramienta nos permitió seleccionar distintos tipos que mostraron diferencias entre ellos aunque no llegaron a ser significativas. No obstante sería necesario aumentar el tamaño muestral y estudiar cada grupo más ampliamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med* 2001;345(14):1067-1068.

Berkovitz A, Eltes F, Soffer Y, et al. ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa. *Andrologia* 1999;31(1):1-8.

De Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology* 2011;78(4):786-791.

Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pellitier R, DeRobertis C, Hennebicq S, Guichaoa M, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Hum Reprod* 2002;17:1292-1298.

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

Petit FM, Frydman N, Benkhalifa M, Le Du A, Aboura A, Fanchin R, Frydman R, Tachdjian G. Could Sperm Aneuploidy Rate Determination Be Used as a predictive test before Intracytoplasmic Sperm Injection? *Journal of Andrology* 2005; 26 (2) :235-241.

Prisant N, Escalier D, Soufir J-C, Morillon M, Schoevaert D, Misrahi M, et al. Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads. *Hum Reprod* 2007; 22:1052-1059.



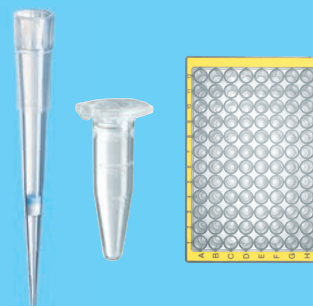
Certeza absoluta

Es su muestra

Experimente la tranquilidad total que garantiza la calidad de los consumibles de Eppendorf. Pida su muestra gratis en www.eppendorf.es/muestras y compruébelo usted mismo.

No comprometa sus resultados:

- > Características únicas para hacer sus tareas de rutina más rápidas y fáciles
- > Sin riesgo de contaminar sus muestras con sustancias presentes en el plástico
- > Grados de pureza adaptados para satisfacer los más altos requisitos



www.eppendorf.es

eppendorf® is a registered trademark of Eppendorf AG, Hamburg, Germany.
All rights reserved, including graphics and images. Copyright® 2012 by Eppendorf AG.

MULTINUCLEACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

MULTINUCLEATION AND EMBRYONIC DEVELOPMENT

Lucía Hortal, María José de los Santos

IVI Valencia

email: luciahortal@gmail.com

Fecha recepción: 3 Abril 2012

Fecha aceptación: 16 Septiembre 2012

RESUMEN

La Multinucleación (MN) definida como la presencia de dos o más núcleos en una o más blastómeras del preembrión humano, aparece entre un 17% y un 69% de los casos dependiendo de series y autores. Su presencia parece estar asociada a diferentes condicionantes exógenos como pueden ser protocolos de estimulación, así como a otras variables morfológicas embrionarias como tamaño de las blastómeras, fragmentación y cinética evolutiva. El objetivo de este estudio es hacer una revisión de los factores que influyen en su aparición y la correlación que presenta con otras características morfológicas, así como examinar su repercusión en el desarrollo embrionario, en las tasas de implantación y en la aparición de aneuploidías. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 23-28.

Palabras clave: MN, aneuploidía, desarrollo embrionario, tasa implantación, selección embrionaria, patrón de división, blastocisto.

SUMMARY

Multinucleation (MN) is defined as the presence of two or more nuclei in one or more blastomeres of human pre-embryo. Its frequency varies between 17% to 69% depending on series and authors. Its presence seems to be linked with different exogenous factors such as stimulation protocols, as well as other morphological variables like the size of embryonic blastomeres, fragmentation and kinetic evolution. The aim of this study is to review the factors that influence the occurrence of MN and its correlation with other morphological features, as well as its implications on embryonic development, implantation rates and the appearance of aneuploidy. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 23-28.

Key words: multinucleation, aneuploidy, embryonic development, implantation rate, embryo selection, division patterns, blastocyst.

INTRODUCCIÓN

La multinucleación (MN), definida como la presencia de dos o más núcleos en una o más blastómeras del embrión, se considera como una característica patológica y de mal pronóstico reproductivo. Aparece indiferentemente en condiciones in vitro e in vivo, caracterizándose por no presentar una distribución normal en la población sino apareciendo como un suceso dependiente y vinculado a cada paciente (Van Royen et al., 2003).

La frecuencia de MN varía en un rango del 17 al 69% en embriones humanos, viéndose incrementada cuando coexiste con otras anomalías morfológicas (Kligman et al., 1996;

Balakier et al., 1997; Jackson et al., 1998; Pelinck et al., 2010; Van Royen et al., 2003). La frecuencia con la que se encuentran blastómeras con MN en embriones en D+2/D+3 procedentes de técnicas de fecundación in vitro, oscila del 14,3% al 74% (Gil et al., 2007) aunque la mayoría de las blastómeras multinucleadas parecen registrarse en D+2. La incidencia decrece del día 2 al día 3 (26,2% vs 11,4%) (Yakin et al., 2005).

La valoración de parámetros morfológicos (número de células, simetría, fragmentación, MN,...), parece ser la práctica más utilizada para seleccionar el mejor embrión a transferir. La MN es aceptada como un criterio morfológico relacionado con

baja calidad embrionaria y se utiliza para decidir qué embrión resulta más adecuado a la hora de realizar una transferencia o una criopreservación. La lenta capacidad de desarrollo o el bloqueo mostrado por algunos embriones está relacionado con la presencia de MN (Hardy et al., 1993), pero además diversos estudios han investigado su influencia negativa en las tasas de implantación y en la aparición de aneuploidías, por ello la utilización de la MN como indicador de calidad en los laboratorios de FIV parece más que justificada (Hesters et al., 2008; Van Royen et al., 2001; Van Royen et al., 2003).

La presencia de MN no siempre es fácil de observar; numerosos factores

como la granulosa del citoplasma, la superposición de blastómeros, etcétera, pueden influir en la valoración de ésta. Debido a la importancia que tiene su detección, diversos autores han aportado el análisis de otros parámetros que pueden ayudar a localizarla. Hardarson et al., 2001, indicaba en su estudio un incremento en las tasas de MN y de implantación en embriones con tamaño desigual de blastómeros y señalaba cómo dichas blastómeros se veían afectadas por un mayor número de anomalías cromosómicas numéricas.

Estudios posteriores encontraban que los blastómeros con tamaño más grande presentaban mayores tasas de MN; el volumen medio registrado en las blastómeros no multinucleadas fue significativamente más pequeño que en las blastómeros multinucleadas (Hnida et al., 2004). Con la intención de aumentar la precisión en la medición del tamaño de las blastómeros se ha utilizado el análisis computerizado para valorar la calidad embrionaria, en cuanto a la evaluación de la fragmentación y la MN.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño que se realizó se encuadra dentro de una Revisión Sistemática, en la que se pretendió recopilar, evaluar y obtener conclusiones de las investigaciones realizadas acerca de la influencia de la MN en el desarrollo embrionario. La búsqueda bibliográfica se realizó en dos fases. La primera automatizada a través de la base de datos MEDLINE. Se establecieron criterios de búsqueda basados en palabras clave (MN, aneuploidía, desarrollo embrionario, tasa implantación, selección embrionaria, patrón de división, blastocisto) y limitado en un principio a los 10 últimos años. Se seleccionó como idioma preferente el inglés y el español. En la segunda fase, se obtuvieron estudios más relevantes de forma manual a partir de la lectura de los estudios seleccionados en la primera fase. Se realizó una búsqueda de los últimos boletines presentados en congresos publicados en la revista ASEBIR, con el fin de obtener la última información sobre este tema en el ámbito nacional.

RESULTADOS

Dada la influencia negativa que la MN tiene sobre el desarrollo embrionario, los objetivos de la presente revisión bibliográfica son recopilar, sintetizar y evaluar los posibles orígenes y factores que intervienen en la aparición de la MN, analizando la influencia negativa de ésta en el patrón de división embrionario y en las tasas de implantación, y su correlación con las anomalías cromosómicas.

FACTORES Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS RELACIONADAS CON LA APARICIÓN DE MN

La relevancia que tiene detectar la MN en las técnicas de selección, ha llevado a estudiar los posibles factores que pueden influir en su aparición, con el fin de poder disminuir su presencia en los laboratorios de FIV. Se han abordado diferentes factores en el proceso de FIV que podrían influir en la aparición de la MN. A continuación, se describirán los factores más influyentes en su aparición, como el tipo de estimulación (principalmente las dosis, el tipo de gonadotropina utilizada y la cantidad de ovocitos recuperados), la maduración ovocitaria posestimulación y las condiciones del cultivo embrionario. Por otro lado, se analizará la aparición de la MN en relación con las otras variables morfológicas, como fragmentación, patrón pronuclear, tamaño de las blastómeros.

POSIBLES FACTORES QUE TIENEN INFLUENCIA EN LA APARICIÓN DE LA MN

Influencia de la estimulación

Varios trabajos hasta la fecha han mostrado que el tipo de estimulación influye en la aparición de blastómeros multinucleadas en los embriones. Su existencia parece estar asociada con ciclos de estimulación ovárica en los cuales los ovarios responden de manera masiva por una alta sensibilidad a la terapia con gonadotropinas (Jackson et al., 1998; Van Royen et al., 2003; Brossa et al., 2008).

En un estudio retrospectivo, Van Royen et al. (2003), analizaron diferentes

parámetros dentro de la estimulación que podrían estar influyendo en la aparición de la MN. El estudio retrospectivo incluyó 10.388 embriones derivados de 1395 ciclos consecutivos de FIV / ICSI en 700 pacientes. Las pacientes pertenecientes a un rango de edad comprendido entre 20 – 45 años, fueron estimuladas con un protocolo largo. Se utilizaron tres gonadotropinas diferentes, las cuales fueron administradas en distintas dosis según requerimientos de la paciente. Los ovocitos obtenidos fueron fecundados mediante FIV o ICSI. Los embriones fueron evaluados en día 2 y día 3 en función de tres parámetros; fragmentación, número de blastómeros y número de blastómeros multinucleadas. Tras el análisis de los resultados se observó que el número de ovocitos recuperados y la dosis de gonadotropina utilizada, tuvieron un impacto en la MN. Concretamente, los ciclos en los que se obtuvieron 9 ovocitos o menos, presentaron embriones con menor MN que cuando se obtuvieron 10 o más ovocitos por punción (29,7% vs 34,5%; RR = 1.16, 95% CI = 1.08±1.25). Las estimulaciones que necesitaron una gran dosis de gonadotropina también fueron asociadas con un incremento en la MN (≥ 2400 UI, 34,6%; < 2400 UI, 32,0%; RR = 1.08, 95% CI = 1.02±1.14). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la duración o el tipo de gonadotropina usada, edad materna o técnica utilizada.

Estos datos fueron analizados en otro estudio retrospectivo posterior, teniendo en cuenta únicamente la dosis de FSH utilizada y no pareció observarse mayor MN. Sin embargo, sí observaron un aumento de la incidencia en aquellos ciclos con dosis > 2400 UI de FSH y en los que se recuperaban más de 10 ovocitos (Brossa et al., 2008).

En los estudios anteriormente citados (Brossa et al., 2008; Van Royen et al., 2003) no se encontraron diferencias significativas en referencia al tipo de gonadotropina utilizada. Sin embargo, Vlaisavljevic et al. (2006) presentaban unos resultados que apuntaban a un menor porcentaje de embriones con MN en las pacientes tratadas con distinto tipo de gonadotropina, hCG versus FSH (30,0% vs 66,7; P= 0,0123).

Otras de las variables asociadas a la estimulación, como por ejemplo el tipo de supresión hipofisiaria, también se ha visto que podría tener repercusión en la MN; por ejemplo en un estudio realizado por De Cassia Savio et al. (2010), se encontraron diferencias que podrían influir en el aumento de la MN. Los resultados mostraron cómo la supresión con agonistas de la GnRH provocaba la obtención de embriones con mayores tasas de MN, en comparación con el uso de antagonistas (33,6% vs 28,3%, $P=0,046$). Estos autores consideraron que la selección de folículos con agonistas era menos exigente, resultando en una mayor recuperación de ovocitos y en la obtención de menores tasas de embarazo a partir de embriones con MN (16,6%, $P=0,07$).

Maduración incompleta de ovocitos

Se ha demostrado que los ovocitos madurados in vitro son sensibles a la edad posmaduración y que esto puede resultar en un alto grado de anormalidades pronucleares, así como en un incremento en las tasas de MN (Balakier et al., 2004).

Los estudios basados en el análisis de ovocitos madurados in vitro han aportado datos relevantes sobre la influencia que tiene en la aparición de embriones multinucleados. En uno de ellos, los ovocitos recuperados en MII formaron el grupo control, el otro grupo lo constituyeron ovocitos en MI sometidos a cultivo hasta alcanzar MII. Todos los ovocitos fueron fecundados mediante ICSI y evaluados posteriormente. Entre los resultados obtenidos, se pudieron observar diferencias significativas con respecto a la presencia de MN en ambos grupos,

siendo casi el doble en los embriones derivados de ovocitos madurados in vitro de MI $\rightarrow$ MII que en el grupo control (23 – 13%; $P<0,0001$) (Tabla I).

Por otro lado, tal y como muestra Nogueira et al. (2000) en su estudio sobre el estatus nuclear y citogenético de embriones derivados de ovocitos madurados in vitro, la MN fue un factor encontrado en un alto porcentaje de estos embriones en día 2 y en día 3 (16% binucleados; 26% multinucleados; 33% anucleados). Además, tan sólo el 60% de estos embriones mostraron una buena morfología y el 44% quedaron bloqueados en su primera división mitótica. Los autores apuntaron la posibilidad de la falta de maduración del citoplasma y de cómo esta deficiencia podría no ser rescatada por el espermatozoide, lo que supondría defectos en el huso mitótico durante la división. Esto afectaría a un óptimo desarrollo embrionario y podría explicar la baja tasa de implantación que presentan estos embriones.

Condiciones de cultivo

Otro factor asociado con la formación de la MN son las posibles variaciones de temperatura o condiciones subóptimas que se puedan dar durante el cultivo del embrión, así como la falta de componentes moleculares que desencadenan la división citoplasmática. Esto podría tener un grave efecto en la función del citoesqueleto, provocando divisiones celulares anómalas (Pelinck et al., 1998; Hardy et al., 1993). Sin embargo hay muy pocos estudios publicados que aborden el tema específico de la MN con este tema en concreto.

RELACIÓN DE LA MN CON OTRAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Coexistencia con fragmentación

Al parecer, la presencia de MN, aunque se puede presentar de forma aislada, tiene cierta asociación con otras variables de carácter morfológico; en este sentido se ha registrado una mayor incidencia de MN en embriones con una alta fragmentación (Hardarson et al., 2001; Vlaisavljevic et al., 2006). En su análisis Van Royen et al. (2003), encontraron diferencias significativas entre los diferentes grados de fragmentación y el empeoramiento de la MN. Los grados de fragmentación fueron definidos en función del porcentaje de fragmentos anucleados existentes en cada embrión ($F1:\leq 10\%$; $F2: 10-20\%$; $F3: 20-30\%$). Embriones con un menor grado de fragmentación ($F1$) mostraban menor MN que embriones con fragmentaciones tipo 2 ($F2$) o tipo 3 ($F3$). Esto podría explicarse por una dificultad de observación debida a la existencia de gran cantidad de fragmentos.

En otro estudio del mismo autor, se pudo comprobar que la tasa de implantación para embriones con un porcentaje de fragmentación mayor o igual al 20%, y que además presentaban MN, fue menor o igual al 3% (Van Royen et al., 2001).

Correlación con el patrón pronuclear

Otro parámetro relacionado con la MN es el llamado *score* pronuclear. Consiste en la evaluación de la morfología pronuclear del cigoto y en la determinación del número y distribución de los cuerpos precursores nucleolares (NPB). Es utilizado actualmente en la valoración de la

Oocytes	ICSI time post-PB extrusion	Total no. of 2PN oocytes	Arrested				Totally fragmented	Embryos with MNBs
			1-4 cell	5-6 cell	7-8 cell	>9 cell		
MI $\rightarrow$ MI	1-1.5 h	38 (100%)	47%	11%	37%	5%	0%	13/36 ^a (36%)
	2-2.5 h	74 (100%)	38%	27%	32%	0%	3%	12/72 ^a (17%)
	3-6 h	86 (100%)	37%	19%	33%	7%	4%	18/80 ^a (23%)
TOTAL		198 (100%)	78 (39%)	40 (20%)	66 (33%)	8 (4%)	6/198 (3%)	43/188 ^a (23%)
Control in vivo matured MII		2535 (100%)	443 (17%)	786 (31%)	1090 (43%)	127 (5%)	89 (4%)	318/2449 ^a (13%)

MNBs = multinucleated blastomeres; MI/MI = metaphase I/II; PB = polar body; PN = pronuclei.

^aOne-cell arrested zygotes were excluded.

Tabla I. Comparación del desarrollo entre embriones humanos originados desde maduración in vitro (MI) y ovocitos madurados in vivo (MII). Balakier et al. (2004)

calidad embrionaria. Su relación con la MN fue evaluada en embriones de día 2 y día 3, en un estudio realizado por Gámiz et al. (2003). Las tasas de MN obtenidas fueron similares en embriones de día 2.

Sin embargo, su porcentaje se duplicó cuando se observó en embriones de día 3 procedentes de cigotos con diferente tamaño pronuclear frente a embriones con el mismo tamaño de pronúcleos, pasando del 5,4% al 10,9%. Tamaños desiguales en los pronúcleos, así como grandes distancias entre ellos, están asociados con elevadas incidencias en la MN y con bajas tasas de desarrollo.

CONSECUENCIAS DE LA MN EN LA VIABILIDAD EMBRIONARIA

Influencia en el patrón de división

Diversos estudios han analizado la relación existente entre la presencia de MN y el patrón de división. Según Van Royen et al., un óptimo patrón de división tiende a presentarse en embriones mononucleados, con una mínima incidencia de MN (Van Royen et al., 2001; Van Royen et al., 2003). El impacto en la tasa de división cuando los embriones presentan MN, se presentó en otro análisis retrospectivo en el cual se mostraba cómo disminuía del 91,6% en embriones sin MN al 56% - 36,4%, si el embrión contenía una o más blastómeras MN, respectivamente ($P < 0,001$) (Yakin et al., 2005).

Hardy et al. (1993) apuntaban que la disminución en la tasa de división podría deberse a la existencia de blastómeras con cromosomas anormales. La presencia de núcleos anormales favorece un arresto en la división embrionaria provocando que estas células no puedan realizar un desarrollo competente (Hardy et al., 1993; Yakin et al., 2005).

La implicación de la MN, en referencia a la influencia sobre el patrón de división y el desarrollo del embrión, también se encuentra al evaluar la tasa de formación de blastocisto. Yakin et al. (2005) registraban una disminución en las tasas de formación de blastocisto en embriones multinucleados (51% vs

11,4%-6,55; $P < 0,0001$). La calidad del blastocisto también se veía comprometida.

La evaluación de la MN y el desarrollo a blastocisto fue estudiada también por Alikani et al. (2000) anotando que tan sólo el 15,9% de los embriones que contenían MN en día 2 y en día 3 llegaron a formar blastocistos normales, frente a una tasa del 31,9% en embriones no multinucleados. La competencia de estos embriones para compactar fue de un 30,6% frente a un 47% en los embriones sin MN. De la misma manera, los valores obtenidos frente a la capacidad de cavitación fueron de un 27,5% frente a un 45,9%, respectivamente.

MN- Anormalidades cromosómicas

La gran mayoría de estudios realizados sobre el estatus cromosómico de las blastómeras multinucleadas muestran que son cromosómicamente anormales (Ambroggio et al., 2011; Kligman et al., 1996; Nogueira et al., 2000; Hardarson et al., 2001). Dichas aportaciones afianzan la idea de que estos embriones son, en su mayoría, incompetentes para producir fetos viables, obteniéndose mayores fallos de desarrollo en ellos; por tanto, la tendencia general es a evitar su transferencia, a menos que no haya otro embrión con mejor pronóstico.

La aparición de estas anormalidades está asociada con asincronías entre los procesos de cariocinesis y citocinesis durante el desarrollo del embrión. Se han propuesto hipótesis como la incompleta división citoplasmática pero completa división del núcleo (Hardy et al., 1993); posibles errores en la segregación de cromosomas, fragmentación parcial del núcleo, organizaciones anómalas del huso mitótico que pueden acabar con errores de empaquetamiento durante la migración de los cromosomas en la anafase (Kligman et al., 1996).

En un análisis con hibridación in situ por fluorescencia (FISH) realizado por Kligman et al. (1996) se mostraron unos resultados que apuntaban a un aumento de anormalidades

cromosómicas en embriones multinucleados frente a embriones mononucleados (76,6% vs 50,9%; $P < 0,001$). Además, manifestaban que la cantidad de células MN en un embrión, la aparición de la MN en D2 o D3, los embriones con un desarrollo lento o normal, y embriones obtenidos a partir de ICSI o inseminados, no presentaban diferencias en cuanto a la incidencia de anormalidades cromosómicas.

Algunos autores han sugerido que la MN podría ser un fenómeno temporal y reversible sin implicar siempre anormalidades cromosómicas. (Gil et al., 2007; Staessen et al., 1998). De hecho, Kligman et al. (1996) propusieron a partir de los resultados que obtuvieron la existencia de dos patrones diferentes de MN. Uno de ellos es el que se produciría en D2 y D3 del desarrollo, el cual produciría mayoritariamente embriones con anormalidades cromosómicas, y el otro, se encontraría en D4 o posterior de desarrollo, y resultaría en embriones cromosómicamente normales.

La desaparición de la MN en etapas posteriores del desarrollo se ha intentado explicar mediante distintas hipótesis. Una de las hipótesis propuestas, es la posibilidad de inestabilidad en el número de núcleos y la posterior fusión de éstos, dando como resultado la desaparición de la MN en estadios posteriores. Otras vertientes, exponen la posibilidad de una reanudación posterior de la citocinesis, el desplazamiento al trofoectodermo de las células cromosómicamente anormales o incluso fallos en el diagnóstico de la MN (Gil et al., 2007).

La presencia de MN puede estar asociada a mosaicismo, como así lo demostró un estudio de Magli y colaboradores en el que se observó que un 92% de los embriones con MN resultaron ser mosaicos (Magli et al., 2001).

Un estudio publicado recientemente se centró en analizar, en embriones de día 2 mediante biopsia y PGD en día 3, el impacto de la MN en las tasas de aneuploidía y en las tasas de implantación. Los cromosomas

analizados fueron X, Y, 13, 15, 16, 18, 21, 22 mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH). Los embriones con blastómeras multinucleadas tendían a presentar una mayor incidencia de aneuploidía en comparación con los embriones que mostraban únicamente blastómeras mononucleadas (85% vs 78%; RR 0,92, IC 95%: 0,84-1,0) (Ambroggio et al., 2011). Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos (RR 0,92, IC 95% 0,84-1,00), los autores consideraron su estudio lo suficientemente consistente para detectar una tendencia al incremento en las tasas de aneuploidías del 7%, entre embriones con MN y sin MN. Ningún embrión con MN consiguió implantar.

A pesar de que una gran cantidad de embriones con MN contienen anomalías cromosómicas, no está claro si dichas aberraciones están concentradas únicamente en las células multinucleadas o son compartidas por el resto de las células. Esto podría tener implicaciones en cuanto al desarrollo, ya que un embrión en el que sus blastómeras MN detuvieran su desarrollo, aún podría desarrollarse normalmente a partir del resto. Por el contrario, embriones con muchas blastómeras MN podrían ver perjudicado su desarrollo. En este proceso de división también influiría el momento de aparición de la MN, ya que si apareciera durante las primeras divisiones embrionarias, todas las células del embrión podrían verse afectadas (Kligman et al., 1996).

Viabilidad de embriones MN e influencia en la capacidad de implantación

Dada la asociación de la MN con anomalías cromosómicas, así como su asociación con el ritmo de división o la elevada tasa de fragmentación y la asimetría, es de esperar que los embriones multinucleados tengan un menor potencial biológico.

Las bajas tasas de implantación derivadas de la presencia de MN en los embriones, hacen de la MN un factor altamente discriminatorio. Diversos artículos resaltan la obtención de tasas de implantación más altas realizando

transferencias de embriones sin MN (15% vs 5%; $P=0,042$) (Jackson et al., 1998), e incluso se apuntan tasas de implantación comprometidas cuando la MN se presenta asociada a la fragmentación (Van Royen et al., 2001). A pesar de la influencia que tiene la MN sobre la implantación, algunos autores han expuesto que el número de blastómeras que conforma un embrión interfiere más que la presencia de MN (Pelínck et al., 2010).

Algunos autores han encontrado una mejora en las tasas de implantación cuando las transferencias son hechas sólo con embriones mononucleados a cuando éstas son mixtas (mononucleadas y multinucleadas), (11,3% - 6%; $P=0,003$) (Pelínck et al., 1998). Gil et al. (2007) no encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos en su análisis con respecto a este dato, pues aunque la tasa de implantación fue mayor en las transferencias mononucleadas (19%) que en las mixtas (15,8%), las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto podría deberse a esa corrección de la MN citada anteriormente.

La baja tasa de implantación de embriones con MN supone una disminución de recién nacidos vivos. Este hecho podría correlacionarse con la existencia de aneuploidías y con la influencia que la MN tiene en el patrón de división (Alikani et al., 2000; Balakier et al., 1997; Kligman et al., 1996; Pelínck et al., 1998; Staessen et al., 1998; Yakin et al., 2005).

Teniendo en cuenta las repercusiones que la MN tiene sobre el patrón de división, la aparición de aneuploidías y las tasas de implantación, parece lógico que estos embriones no se utilicen para realizar transferencias, a no ser que no haya otros embriones para elegir.

Diversos estudios han demostrado la existencia de recién nacidos sanos a partir de transferencias con embriones con MN. El estudio de Balakier et al. (1997) indicaba la transferencia de 19 embriones con MN, de los cuales tan solo 4 implantaron (21%), dos de ellos acabaron en aborto espontáneo

y dos finalizaron con el nacimiento de dos recién nacidos sanos. Los embriones que llegaron a término estaban formados por blastómeras multinucleadas y mononucleadas, considerando que estos embriones pudieran sufrir un bloqueo de sus blastómeras con MN y un desarrollo a partir de las mononucleadas. Esto podría indicar la totipotencia blastomérica, es decir, la necesidad de tener sólo una célula mononucleada para realizar un desarrollo embrionario completo en estadio de 2 células.

En la misma línea, Van Royen et al. (2003) obtenían unos resultados en los que se apuntaba el nacimiento de un niño sano a partir de una transferencia simple de un embrión con MN. Pelínck et al. (1998) también mostraron resultados de recién nacidos vivos a partir de embriones con MN, en los cuales de 8 transferencias realizadas, tan sólo se obtuvo el nacimiento de un niño sano. También Jackson et al. (1998) mostraron 25 ciclos en los que todas las transferencias tenían embriones con al menos una blastómera con MN. Implantaron 3 embriones, cuyo final fue un aborto espontáneo y dos gemelos sanos.

CONCLUSIONES

A la vista de las repercusiones que la MN tiene sobre las tasas de implantación, la aparición de aneuploidías y la viabilidad embrionaria, parece clara la necesidad de realizar esfuerzos en los laboratorios de embriología clínica centrados en mejorar su detección y conocer su repercusión biológica en el embrión como fenómeno aislado. Ahora bien, dichos esfuerzos no sólo deberían ir dirigidos a realizar una buena evaluación morfológica del embrión, sino que habrían de centrarse en controlar todos aquellos factores externos que tienen influencia en la aparición de dicha patología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;15: 2634-2643.

Ambroggio J, Gindoff PR, Dayal MB, Khaldi R, Peak D, Frankfurter D, et al. Multinucleation of a sibling blastomere on day 2 suggests unsuitability for embryo transfer in IVF-preimplantation genetic screening cycles. *Fertil Steril* 2011; 96: 856-859.

Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod* 1997; 12: 800-804.

Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum Reprod* 2004; 19: 982-987.

Brossa M, Blanch X, Antich M. Incidencia de multinucleación en IVF-ICSI. *ASEBIR* 2008; 16-18.

De Cassia Savio FR., Souza SA., Paes De Almeida Ferreira Braga, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Blastomere multinucleation: Contributing factors and effects on embryo development and clinical outcome. *Hum Fertil* 2010; 13: 143-150.

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

Gil M, D'Ommar G, Poo ME, Sosa A, Piras M, Piras R, et al. Insights on blastomere nuclearity. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 17-22.

Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for

aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-318.

Hardy K, Winston RM, Handyside AH. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 549-558.

Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Mendez Lozano DH, Feyereisen E, Frydman R, et al. Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril* 2008; 89: 1677-1684.

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod* 2004; 19: 288-293.

Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998; 70: 60-66.

Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996; 11: 1492-1498.

Magli MC; Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal abnormalities in embryo *MolCell Endocrinol* 2001; 183: S29-34.

Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in

vitro-matured oocytes. *Fertil Steril* 2000; 74: 295-298.

Pelinc MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod* 1998; 13: 960-963.

Pelinc MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ, van Echten-Arends J, Arts EG. Embryo quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified natural cycle in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010; 94: 527-534.

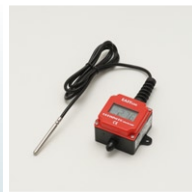
Staessen C, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum.Reprod* 1998; 13: 1625-1631.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum.Reprod* 2001; 16: 326-332.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum.Reprod* 2003; 18: 1062-1069.

Vlaisavljevic V, Cizek-Sajko M, Kovac V. Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril* 2006; 86: 487-489.

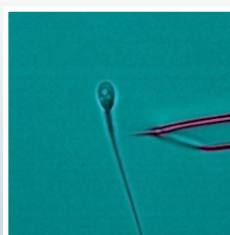
Yakin K, Balaban B, Urman B. Impact of the presence of one or more multinucleated blastomeres on the developmental potential of the embryo to the blastocyst stage. *Fertil. Steril* 2005; 83: 243-245.



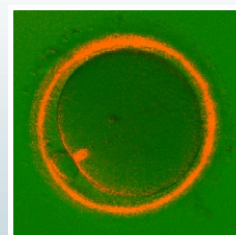
Alarma



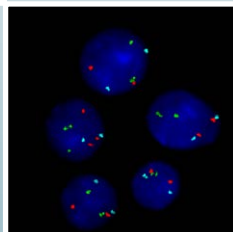
IMSI



Polarización



Time-lapse



FISH



Biopsia TFE

Think Quality

■ Herramientas de precisión

Sistemas de microscopía para observación y micromanipulación

■ Control permanente de parámetros

Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

■ Selección de los mejores candidatos

Evaluación de la calidad oocitaria y del espermatozoides, y selección de los mejores embriones

■ Mejores decisiones

Haga un mejor análisis teniendo toda la información

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

Olympus España S.A.U
informacion.micro@olympus.es

¿POR QUÉ LOS SOCIOS DE ASEBIR PARTICIPAN TAN POCO EN LOS TEMAS DE DEBATE DE NUESTRA REVISTA?

Jorge Cuadros, Marga Esbert
Vocalía de Publicaciones
Junta Directiva de ASEBIR

Cuando propusimos como tema de debate para el número de diciembre 2012 “¿Por qué los socios de ASEBIR participan tan poco en los temas de debate de nuestra revista?”, teníamos la esperanza de que algunos de nuestros compañeros sintieran algo de vergüenza torera (o antitaurina, según) y escribieran comentando su opinión sobre este tema. A fecha 30 de septiembre, último día para enviar los artículos, no hemos recibido ningún documento. Sí es verdad que, para este número, los editores de la revista no hemos llamado, escrito e insistido en repetidas ocasiones a los compañeros más cercanos para que nos escribieran sus comentarios sobre los diversos temas propuestos en los sucesivos números de nuestra revista. Hay que recordar que en la sección de debate se puede escribir sobre cualquier tema propuesto en los números anteriores. Esto descartaría la posibilidad de que los temas sugeridos no fueran de interés para los socios; con los años que lleva nuestra revista, se han tratado tantos temas que se podría escribir casi sobre cualquier cosa relacionada con la biología de la reproducción. También hay que llamar la atención sobre el hecho de que hace algunos años resultaba difícil inclusive conseguir que los socios escribieran artículos originales, lo que en los últimos números no ha sido tan crítico, quizás por el incentivo añadido por la indización de nuestra revista en bases de datos nacionales e internacionales. Sin embargo, la sección de debates sigue siendo nuestra asignatura pendiente.

Aun siendo evidente, queremos recalcar que la revista ASEBIR es el órgano de expresión y de comunicación de los biólogos de la reproducción en España. Es cierto que difícilmente podríamos competir con revistas internacionales de alto índice impacto a la hora de elegir dónde enviar nuestros trabajos originales. Sin embargo, siempre hay estudios que podrían resultar de interés para nuestra comunidad científica y que quizás no podríamos enviar a revistas de mayor peso, por ser los resultados preliminares, por el número de casos, etc. La revista ASEBIR podría ser un medio mediante el cual comunicar resultados que consideramos importantes, aun cuando, por ejemplo, no hayan alcanzado significación estadística. Además, el Aula Joven, cuyos artículos enviados a partir del Congreso de Girona competirán por dos inscripciones gratuitas para nuestro próximo Congreso de Sevilla, tiene el aliciente de permitir la publicación de artículos de los socios más jóvenes que se están iniciando en la investigación. Por otra parte, es indiscutible el interés de las secciones de Actualidad o de Formación Continuada. En resumen, publicar en la revista ASEBIR debería ser un anhelo para todos nuestros socios.

La sección de Debate está pensada para que los compañeros expresen en cada número de la revista su opinión libre sobre un tema específico (e insistimos, sobre todos los temas sugeridos con anterioridad), sin estar sujeta a revisión.

Es difícil pensar que los biólogos de la reproducción no tengamos una opinión formada sobre la tecnología del time-lapse, el tema de debate de junio 2012. Sólo recibimos dos opiniones, a favor ¿será que todos estamos convencidos de sus bondades? Probablemente no. ¿Por qué no lo escribimos? Posiblemente los Senior estemos muy ocupados para dedicar tiempo a esto, mientras que quizás los Junior sientan que les falta experiencia para escribir con soltura. ¿No sería para los jóvenes una manera ideal de empezar a escribir, además en español, textos que luego podrían ser revisados por sus compañeros más expertos? Curiosamente, en el número de junio 2010, donde el debate fue sobre la publicidad de los resultados del Registro SEF 2008, cuyas consecuencias sólo nos tocan tangencialmente a los embriólogos clínicos (en nuestra opinión), los comentarios abundaron.

Una posibilidad sugerida en la última Asamblea de ASEBIR en el Congreso de la SEF de Granada, fue que se aprovechara esta sección de Debate de una manera más general, como “Cartas al Editor”, de tal manera que los socios se pudieran expresar ya sobre cualquier tema relacionado con nuestros intereses. Bienvenido sea.

Cabe la posibilidad de que a corto plazo nuestra revista cambie a un formato on-line, pero eso no debe significar más que la necesidad de redoblar nuestros esfuerzos para mantener la calidad y el interés de la revista ASEBIR.

En este artículo se presenta un resumen de la encuesta realizada por Antonio Urríes, enviada a los socios de ASEBIR, sobre la situación profesional de los embriólogos clínicos, que fue motivo de la Sesión de Debate en el último Congreso ASEBIR de Girona

EMBRIÓLOGOS CLÍNICOS ¿SOMOS REALMENTE LO QUE QUEREMOS SER?: LA ENCUESTA

Antonio Urríes.

Director Unidad Reproducción Asistida Quirón Zaragoza

e-mail: aurries.zar@quiron.es

INTRODUCCIÓN

Ya ha pasado más de un año desde el Congreso de Girona en el que se presentaron los resultados de la encuesta que da título a este artículo. Desde entonces muchos de vosotros habéis pedido que los resultados fueran publicados para su consulta posterior y eso es lo que pretende este trabajo. Naturalmente es complicado mostrar en pocas líneas lo que reflejan dos encuestas, casi 50 preguntas y más de 100 diapositivas, sólo espero que muestre lo suficiente como para que el debate continúe.

Y lo primero que debo hacer es dar las gracias a los 240 asociados de más de 150 centros de reproducción que colaboraron en la encuesta y pedir disculpas a los que por algún motivo no la recibieron. Éste es un buen momento para que todos revisemos las preguntas y analicemos las contestaciones.

La pregunta inicial todos la conocéis: **"Embriólogos Clínicos: ¿somos realmente lo que queremos ser?"** Y, si queréis, se puede decir ya la respuesta: NO.

Únicamente un 12% de los que contestaron a la encuesta se manifestaron totalmente satisfechos con la forma como realizan su trabajo.

La encuesta de los asociados estaba formada por 33 preguntas divididas en 3 partes. Una primera que trataba sobre nuestra formación y lugar de trabajo, una segunda que hablaba sobre la forma en la que realizamos ese trabajo y una tercera sólo de opinión.

Pero esta encuesta, que para mí era la parte más importante, no era la única

que manejábamos, ya que también se envió un breve cuestionario a distintos organismos y sociedades científicas como son las Juntas Directivas de ASEBIR y de la SEF, la Asesoría Jurídica de Derecho Sanitario Asesores, la Comisión de Sanidad del Colegio Profesional de Biólogos de Aragón y a un Magistrado de Zaragoza que me ha ayudado en este maremágnum de Leyes y Reales Decretos, algunos de los cuales, por cierto, ya derogados pero con los que seguimos contando como si siguieran vigentes... en perjuicio nuestro.

Y todo ello para intentar plantear un debate sobre lo que somos... lo que queremos ser... y lo que podemos ser.

CAPÍTULO 1: LA ENCUESTA

Según datos de ASEBIR del año 2011 en la asociación había 718 asociados,

de los cuales alrededor de 500 tenían actividad en unos 250 centros de reproducción asistida humana.

De ellos participaron en la encuesta 240 asociados (pertenecientes a 150 centros), siendo un 83% biólogos, 6% médicos, 5% farmacéuticos, 2% biotecnólogos, 2% veterinarios, 1% químicos y 1% bioquímicos.

En cuanto a su *formación específica*, como datos más remarcables, el 49% tenían un Master en Reproducción Asistida, un 38% disponían de la Certificación ASEBIR (2010-2011) y un 34% poseían la acreditación de *Senior Clinical Embryologist* (ESHRE).

Respecto al ámbito de trabajo, la mayor participación la hemos tenido en asociados que realizan su actividad dentro de Clínicas/Centros específicos

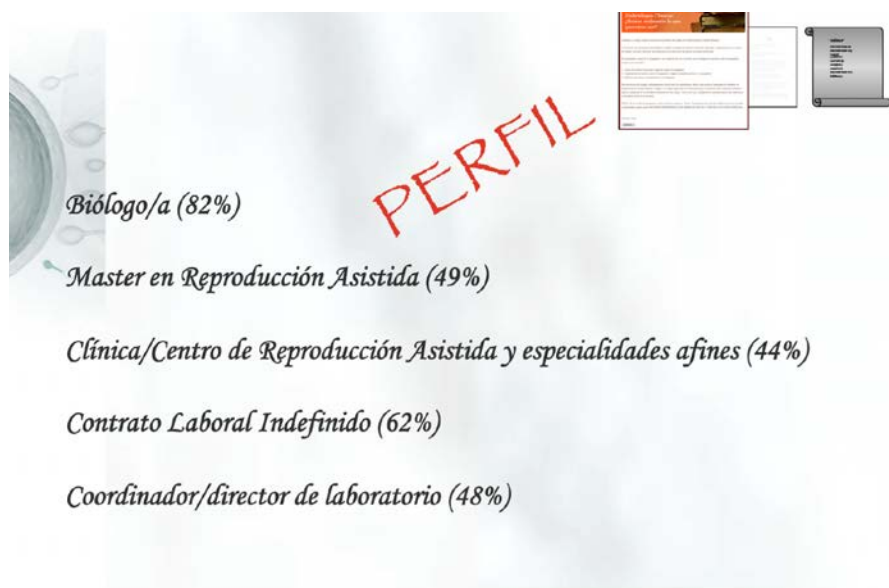


Figura 1

de RHA y especialidades afines (44%) y de Unidades de Reproducción Asistida ubicadas en Clínicas/Hospitales privados (34%). Únicamente un 14% de los que realizaron la encuesta pertenecían a Unidades de Reproducción Asistida de Hospitales Públicos.

De todos ellos, el 62 % disponían de un contrato laboral indefinido, pero también es de destacar que hay un 6% que son propietarios o copropietarios de la empresa, aunque de éstas únicamente hay 3 empresas exclusivamente propiedad de embriólogos.

En cuanto al *cargo profesional* el más frecuente es el de Director/Coordinador de Laboratorio (48%) frente al de Personal de Laboratorio con actividad en embriología (40%). Un 4% (8 de los encuestados) manifestaron ser los Directores/Coordinadores de la Unidad o Centro. Más adelante debatiremos sobre si esto es posible.

Con todo ello, el perfil del *Embriólogo Tipo* (fig.1) es el de un Biólogo (82%) con un Máster en Reproducción Asistida (49%) que trabaja en una Clínica/Centro de Reproducción Asistida y especialidades afines (44%), con contrato laboral indefinido (62%) y que ejerce de Coordinador/Director de Laboratorio (48%).

A continuación fueron planteadas una serie de preguntas encaminadas a determinar nuestra participación en la aplicación de una Técnica de Reproducción Asistida (TRA) para lo que distinguimos las siguientes fases (fig 2):

1. Fase diagnóstica
2. Fase de indicación de la TRA
3. TRA propiamente dicha
 - a. Fase informativa
 - b. Realización TRA
 - c. Firma/visado de la actividad profesional
 - d. Análisis/valoración posterior

Pero empecemos por el principio. ¿Tenemos sitio dónde trabajar? ¿Dónde se realizan estas fases?

Está claro que todos disponemos de un Laboratorio donde poder realizar las TRA, pero difícilmente podremos participar en procedimientos que conlleven contacto con los pacientes, como son las fases diagnósticas, informativas y de análisis si no disponemos de un despacho en el que atenderlos. Y éste no es un tema trivial, cuando a la pregunta final de *¿Qué cambiaríais?* un porcentaje muy elevado de vosotros solicitabais un contacto mayor con las parejas como luego veremos.

Así llegamos a la primera pregunta.

¿Dispones de un espacio físico donde atender a las parejas que acuden a tu centro? Según pudo verse, un 79% de los encuestados disponían de un despacho propio o compartido donde hacerlo, aunque también es de destacar que un 12% nunca habla con los pacientes.

A partir de aquí vamos a ver cuál es nuestro grado de implicación en las distintas fases.

1.- Fase Diagnóstica. A la pregunta de *¿Quién atiende a los pacientes en una primera cita?* la respuesta mayoritaria fue: "Únicamente los atienden los ginecólogos" (80%), siendo ellos también los que deciden las pruebas a realizar en esa fase (79%), aunque un 66% de los embriólogos manifiestan poder "sugerir" la realización de determinadas pruebas.

Por otra parte, únicamente un 6% de los encuestados sería proactivo a la hora de prescribir por sí mismo al paciente una prueba que considerara necesaria (FISHe, cultivo, cariotipo,...). El resto, como mucho, lo comentaría con el ginecólogo para que éste lo valorara y decidiera su prescripción o no.

2.- Indicación de la Técnica. Una vez realizado el estudio *¿Quién decide qué TRA debe aplicarse?* El 58% de los encuestados ha manifestado que esa responsabilidad recae en los ginecólogos, aunque pueden "sugerir". Un 32% manifiesta participar de forma activa y cabe destacar que un 5% dice que esa responsabilidad en su centro recae directamente en los embriólogos.

¿Y que pasaría si no estuvieras de acuerdo con la indicación? Frente a esta pregunta un 44% haría lo que le indicara el ginecólogo (incluso un 4% no ve cuál es la indicación por la que realiza su trabajo), pero también un 40% manifiesta que no realizaría nunca una técnica con la que no estuviera de acuerdo.

3.a- TRA. Fase Informativa. Ya se ha decidido la TRA a realizar, por lo que primero habrá que informar a los pacientes sobre lo que se les va a hacer.



Figura 2

Y esto nos lleva a la siguiente pregunta: *¿Tienes contacto con los pacientes durante la fase informativa previa?* En la respuesta únicamente un 27% contestó que explica personalmente a los pacientes lo que se les va a realizar (aunque gran parte lo hace por teléfono). A éstos habría que sumar un 4% que lo hacen (únicamente) en caso de que se les vaya a realizar un DGP.

3.b- TRA. Realización. Vamos a imaginar que les estamos haciendo un ciclo de FIV. Ya tenemos los óvulos, y ahora... *¿quién mantiene el contacto con la pareja durante el proceso?* Parece ser que únicamente un 36% de los embriólogos asumen esa responsabilidad, un 33% la comparten con los ginecólogos y un 31% no participan en absoluto, pudiendo ser incluso los auxiliares o personal de enfermería los que realizan esa actividad.

3.b- TRA. Firma. El proceso ha finalizado y hay que presentar un informe de la actividad profesional realizada. *¿Firmáis ese informe?* Un 53% firma el informe de forma individual o conjunta con otros profesionales y un 32% expone que no firma ningún informe. Destacar que un 4% dice que no considera que deba hacerlo.

Y ahora una serie de ejemplos:

Una pareja acude para IAC pero observas que el semen no reúne unas condiciones mínimas necesarias para ello. ¿Qué harías? El 70% manifestó que comentaría el caso con el ginecólogo (un 31% antes de capacitar el semen), pero que finalmente asumiría la decisión del médico. Un 21% comentaría el caso con el ginecólogo y la pareja y no realizaría la capacitación del semen salvo decisión final de los pacientes.

Pareja con indicación de FIV con inseminación convencional pero que el semen bajo tu criterio sería para ICSI. ¿Qué harías? Un 75% respondió que cambiaría la indicación sin ninguna duda bajo su responsabilidad, pero un 7% hablaría con el ginecólogo y mantendría la indicación que el médico considerara.

¿Y si fuera al revés?:

Pareja con indicación de ICSI pero que el semen bajo tu criterio sería válido

para FIV con inseminación convencional. Aquí la cosa cambia. Frente a este planteamiento, únicamente un 28% cambiaría la indicación. El resto no modificaría la técnica.

Y si en los casos anteriores finalmente no cambias la indicación y hay un fallo de fecundación ¿de quién creéis que es la responsabilidad? Un 10% consideran que la responsabilidad es exclusivamente del ginecólogo y un 52% compartida con nosotros. Únicamente un 24% considera que la responsabilidad sería nuestra al haber cometido un error en nuestra función. Luego veremos que dice la ley sobre esto... y los propios ginecólogos.

Otro caso:

Dudas seriamente de la viabilidad del ciclo y consideras que habría que cancelarlo. ¿Cuál sería tu actitud? Frente a esto un 56% la cancelaría bajo su responsabilidad, pero también nos encontramos con un 31% que informaría al ginecólogo y haría lo que él decidiera.

Por último:

Podría darse en tu centro esta situación: Recibes a una pareja en una primera cita. Analizas el estudio realizado y le diagnosticas Factor Tubárico. Le indicas una FIV, le informas de la técnica y la remites a ginecología para que comience

el proceso de estimulación ovárica. Frente a esta hipótesis un 11% manifiesta que podría darse con total normalidad y un 72% que nunca podría darse. Un 20% (del 72 %) pensó directamente que se trataba de una broma.

Por ello, el perfil que nos queda (fig. 3) es el de un embriólogo que dispone de despacho (propio o compartido) (79%), pero del que hacemos poco uso, ya que no realizamos primeras citas (80%) ni participamos en la fase diagnóstica (79%). No decidimos la TRA a aplicar (68%), aunque podemos "sugerir" (65%). No informamos a los pacientes de lo que les vamos a hacer (61%). Mantenemos el contacto con las parejas durante la Fase de Laboratorio (69%). Firmamos el informe de la actividad realizada en un 53% y no participamos en el análisis posterior del ciclo realizado (78%).

Y a pesar de ello nos consideramos *Especialistas en Reproducción Asistida* (84%) y *Responsables de nuestras actuaciones* (62%). Aunque únicamente, como veíamos al principio, un 12% se encuentra totalmente satisfecho de la forma como realiza su actividad profesional.

Y respecto a la pregunta colofón de *¿Qué cambiarías?* Ha habido una serie de respuestas que se han repetido de

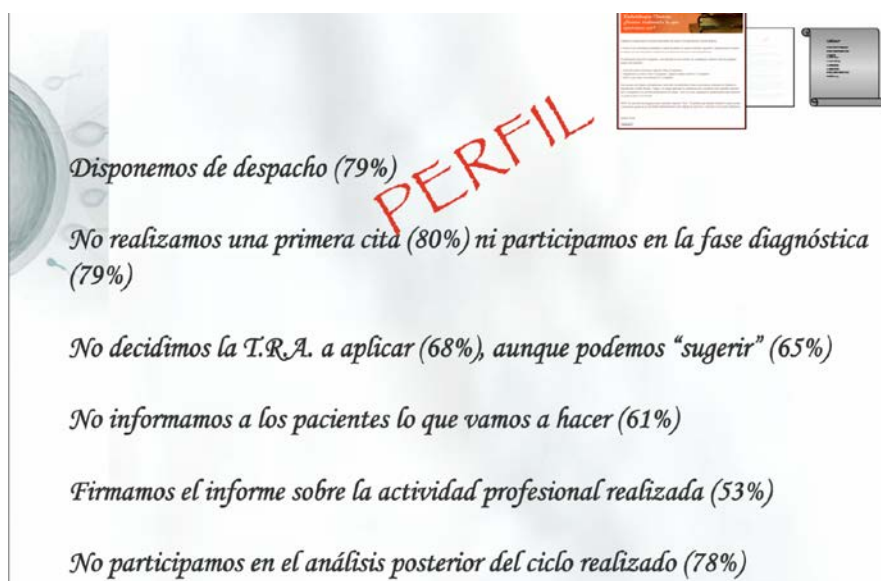


Figura 3

manera reiterada, cambiando solamente la forma de expresarlo. Por ejemplo:

Mayores competencias, responsabilidad, respeto a nuestro trabajo... Contacto con el paciente... Debería ser obligatorio que a la pareja la viera el embriólogo... Equiparación de derechos, condiciones y sueldos con el resto de los profesionales... Que no se nos considere personal auxiliar... Autonomía, respeto y responsabilidad en nuestro trabajo... Menos intrusismo y mayor respeto en mi criterio profesional... Concienciación a todo el mundo sobre en qué consiste el trabajo en equipo y la responsabilidad compartida... y sigue. En resumen, competencias, responsabilidad y respeto a nuestro trabajo.

(NOTA: LA LEY, LOS FACULTATIVOS Y LAS UNIDADES ASISTENCIALES)

Antes de entrar de lleno en la encuesta a las sociedades, quiero hacer un paréntesis para mencionar un par de leyes a las que luego se hace alusión. Para el análisis he contado con la asesoría de un magistrado y de un gabinete de abogados ("los intérpretes de la ley" en adelante).

La primera es el Real Decreto 413/1996 de 1 de Marzo, por el que se establecen los requisitos técnicos y funcionales precisos para la autorización y

homologación de los centros y servicios sanitarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida. Borrado. Está totalmente derogado. Y con ello la figura de la responsabilidad única, ya que ha sido sustituido por el Real Decreto 1277/2003 de 10 de Octubre, por el que se establecen las bases generales sobre autorización de centros, servicios y establecimientos sanitarios y por la Ley 14/2006 de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.

De ellas tendríamos que enmarcar sobre todo el Capítulo VII, Art. 25 de la Ley 14/2006 que dice: *De las diferentes infracciones será responsable su autor.* O sea, nosotros somos los responsables de lo que hagamos en nuestros laboratorios.

Y por otra parte, si leemos el RD 1277/2003, veremos que define a un *Centro de reproducción humana asistida como un centro sanitario en los que equipos biomédicos especialmente cualificados realizan técnicas de reproducción asistida o sus derivaciones.* Ya un *Centro sanitario como un conjunto de medios técnicos e instalaciones en las que profesionales capacitados, por su titulación específica o capacidad profesional realizan básicamente actividades sanitarias... y pueden estar integrados por uno o varios servicios sanitarios (Unidades Asistenciales).*

Con ello manifiesta claramente que esa formación específica que requiere un facultativo no necesariamente precisa una titulación oficial. En estos momentos no tenemos obligación de tener el título de especialistas. Puede ser asumida por nuestra "capacidad profesional". Ya sólo nos quedaría saber quién otorga esa capacidad.

Por último, en la figura 4, se puede ver un esquema de las unidades asistenciales de las que puede estar formado un Centro de Reproducción Asistida Humana según el RD.

Y esto es lo que somos. Podemos cambiarle el nombre y llamarlo como queramos... servicio... unidad de R.A... centro de fertilidad... porque al final toda nuestra actividad está contenida en estos conceptos.

Y en la parte de abajo de la figura aparece sobre quién puede recaer la responsabilidad de dichas unidades, bien en un médico especialista en obstetricia y ginecología o en un facultativo con formación y experiencia en biología de la reproducción.

Y así, si queremos montar un servicio que haga Inseminaciones Artificiales (IA) deberemos disponer de una unidad U.27 y de una U.30 con sus consiguientes co-Responsables (una unidad U.27 corresponde a una consulta de ginecología). Y si lo que queremos es un Banco de semen, sólo necesitará estar bajo la responsabilidad de un Facultativo (con formación y experiencia en biología de la reproducción).

¿Y hace falta que os diga quién es ese Facultativo del que se habla?

Porque no nos olvidemos de la ley 14/2006. Si el responsable de lo que se haga es su autor y somos nosotros los que realizamos la actividad en un laboratorio de capacitación espermática, banco de semen, etc... o estamos trabajando donde no debemos, o somos claramente los facultativos a los que se refiere la ley.

Seguimos con el capítulo 2.

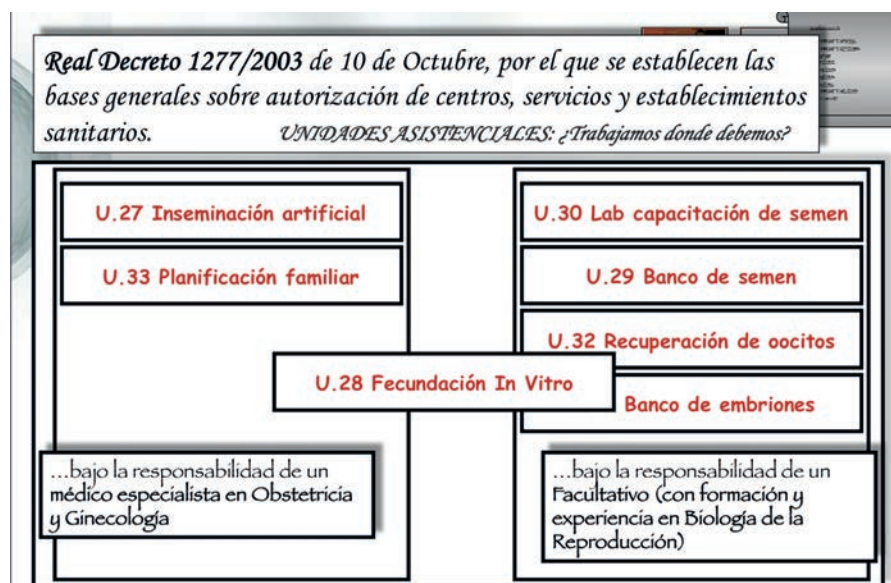


Figura 4

CAPÍTULO 2: LAS SOCIEDADES CIENTÍFICAS, LOS COLEGIOS PROFESIONALES Y LA LEY

¿Qué dicen sobre esto las sociedades científicas (Juntas directivas de ASEBIR y SEF), colegios profesionales (Comisión de Sanidad del Colegio Profesional de Biólogos de Aragón) y los intérpretes de la ley (Magistrado de Zaragoza y Gabinete Jurídico)? A todos ellos les fue enviada una breve encuesta formada por 8 preguntas (fig. 5). Voy a intentar resumir la respuestas remarcando lo más determinante.

1ª Pregunta: ¿Podría considerarse la actuación profesional de un embriólogo clínico equivalente a la de un Licenciado Sanitario o Facultativo? En este caso la respuesta fue unánime: SÍ. Todos coincidían en manifestar en que cuando la ley habla de facultativo se está refiriendo claramente a los embriólogos.

2ª Pregunta: Puede un embriólogo clínico prestar servicios de información y asesoramiento a los pacientes en aspectos relacionados con la R.H.A? Igualmente todos los encuestados contestaron que sí. Como notas a remarcar, según Derecho Sanitario Asesores "todo profesional que atienda a un paciente durante un proceso asistencial o le aplique una técnica o procedimiento concreto es también responsable de informarle de ese aspecto".

Por otra parte, dentro de los estatutos de los propios colegios profesionales se marcan los principios básicos reguladores del ejercicio profesional. A modo de ejemplo, dentro de las funciones de la profesión regulada por el Colegio Profesional de Biólogos, se incluyen el Consejo Genético y la Planificación Familiar como una de las funciones que puede desempeñar el biólogo en su actividad profesional.

Si recordáis, según la encuesta ni realizamos servicios de asesoramiento (80%), ni informamos al paciente de lo que vamos a hacer (74%).

3ª Pregunta: ¿Puede un embriólogo clínico solicitar la realización de pruebas complementarias a una pareja bien sea

en proceso de estudio de esterilidad o de aplicación de TRA? En este caso se rompió la unanimidad. Tanto la Junta Directiva de ASEBIR como de la SEF, el COPBA y mi gabinete jurídico indicaron que sí. "Como responsables de la actuación profesional debemos solicitar todas las pruebas diagnósticas necesarias para la correcta realización de nuestro trabajo" (COPBA). ASEBIR indicó igualmente que "podemos solicitar pruebas complementarias (lo que implica también su interpretación)" dentro del concepto "el embrión como paciente".

Y ojo a este concepto, porque tiene más importancia de lo que pueda parecer, ya que a nosotros no nos interesa saber los niveles de glucosa de una mujer. Lo que nos interesa es saber si los gametos con los que trabajamos, y de los que somos responsables, tienen alguna infección o alteración genética. Si están sanos. Si vamos a poder disponer de unos embriones óptimos. Y si para saberlo tenemos que realizarles pruebas diagnósticas, será nuestra obligación solicitarlas e interpretarlas. Y si para ello hay que estudiar a una pareja y pedirles unas serologías, pues habrá que hacerlo. No para saber cómo están ellos, sino para evitar el tener un embrión con problemas.

El punto discrepante lo dio Derecho Sanitario Asesores, al manifestar que

"corresponde al médico la indicación de pruebas dirigidas al diagnóstico y tratamiento del paciente".

Si recordáis, sólo un 6% de los encuestados solicitaría una prueba complementaria a un paciente.

4ª Pregunta: ¿Ese mismo profesional puede decidir si, dentro de un ciclo de FIV, realizar FIV convencional o ICSI en base a la calidad del semen observada en ese momento y a su criterio? De nuevo tanto la SEF, ASEBIR, COPBA y el gabinete jurídico consultado manifestaron que SÍ. "El ejercicio responsable de una profesión regulada se basa en la independencia del criterio profesional sin límites ilegítimos o arbitrarios en el desarrollo del trabajo realizado. Cualquier indicación al respecto por parte de otro profesional distinto al que vaya a realizar la actuación profesional deberá ser siempre tomada como sugerencia" (COPBA).

Derecho Sanitario Asesores de nuevo manifestó que esa responsabilidad corresponde al médico.

Aparentemente esto contradice las leyes expuestas anteriormente, por lo que planteamos la siguiente pregunta:

5ª Pregunta: ¿En quién recae la responsabilidad de toda actividad que

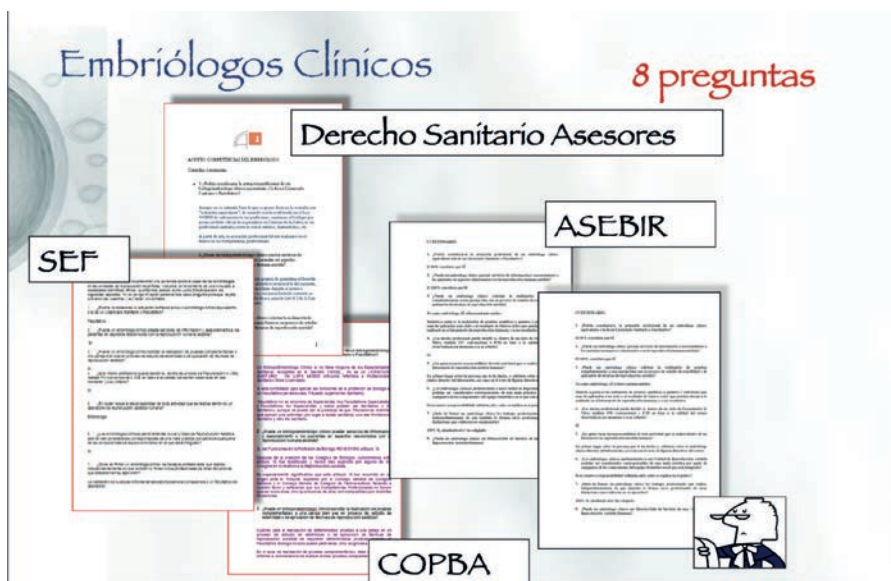


Figura 5

se realice dentro de un Laboratorio de RHA? Aquí volvemos a tener unanimidad en la respuesta. Todos coinciden en señalar que “según la Ley 14/2006 y los principios reguladores de la actividad profesional el responsable primero de la actividad realizada es la persona que la realiza, y de forma solidaria el Director del Laboratorio, así como el resto de las figuras directivas del centro”.

Rara responsabilidad se nos da si se nos niega autonomía en nuestro trabajo y, tal como hemos visto en la encuesta, únicamente un 62% asumimos que somos responsables de nuestra actividad profesional.

Pero ¿sólo somos responsables de lo que nosotros hacemos?

6ª Pregunta: ¿Los embriólogos clínicos pertenecientes a una URA podrían ser considerados co-Responsables de una mala práctica por parte de cualquiera de los componentes del equipo en el que está integrado? Respuesta unánime. Sin ninguna duda. SÍ. No sólo somos responsables de lo que hacemos, sino que podemos ser co-Responsables de lo que hagan los demás, siempre que con nuestra acción u omisión se favoreciera esa mala práctica.

7ª Pregunta: ¿Debe de firmar un embriólogo clínico los trabajos profesionales que realice, independientemente de que también lo firmen otros profesionales de otras titulaciones que colaboren en su ejecución? De nuevo unanimidad en el SÍ. Tanto ASEBIR como el COPBA remarcan la importancia de añadir el “número de colegiado a la firma”. La SEF por su parte remarca la importancia de que “cualquier informe de laboratorio siempre corresponde a un facultativo de laboratorio”.

Recordar que sólo el 53% de los encuestados firmaban el informe de su actuación profesional.

Dejamos la 8ª pregunta para el final y volvamos otra vez con el cuadro de las Unidades Asistenciales porque, creo que ya está claro, somos nosotros los Facultativos a los que se refiere. Todos coinciden en ello.

Ya sólo nos queda saber cómo demostramos nuestra formación y experiencia en biología de la reproducción, y en ello lleva trabajando ASEBIR muchos años. Pero ahora, en este momento, a ver quién puede negar esa capacidad a un embriólogo con 10, 15, 20 años de actividad profesional.

Parece que en este momento la legislación actual es positiva para nuestros intereses profesionales. O por lo menos no descaradamente negativa. Además, tanto sociedades científicas (SEF incluida) como colegios profesionales coinciden en ese respeto hacia nuestras competencias. Pero pensar que esto puede cambiar en cualquier momento y cualquier desarrollo posterior de estas leyes puede dar un giro total a estos planteamientos.

Y el último capítulo:

CAPÍTULO 3: EL DIRECTOR DEL CENTRO

8ª Pregunta: Consideráis que un embriólogo clínico podría ser Director/Jefe de Servicio de una Unidad de Reproducción Asistida Humana? Esta pregunta estaba también incluida en la encuesta a los asociados. Según los asociados de ASEBIR un 95% ha considerado que SÍ que deberíamos poder ser Directores de una Unidad, pero de ellos un 70% cree que la Ley no lo permite. Por otra parte decir que un 5% directamente considera que no estamos capacitados para ello.

Y ¿Qué opinan ASEBIR, SEF, COPBA, DSA y los intérpretes de la ley? En esta pregunta es en la que hay más discrepancia. ASEBIR dice claramente que SÍ, con la excepción de que en los centros públicos el cargo de Jefe de Servicio sólo puede ocuparlo un especialista, por lo que no se podría optar a ese puesto mientras no dispongamos de especialidad reconocida (en cambio sí que se podría ocupar el cargo de Jefe de Sección). La SEF considera que “No puede, pero debería poderse”. El COPBA dice que “el RD 1277/2003 establece que la dirección de una Unidad Asistencial como esa la pueden realizar profesionales capacitados tanto por su titulación

oficial como por su habilitación profesional, dejando cualquiera de esas dos opciones para su selección. En base a ello no existe contraindicación para que un facultativo capacitado lo pueda dirigir”. Y por último DSA manifiesta que “no sería correcto que el responsable global del centro fuera exclusivamente un embriólogo”.

¿No sería correcto? Parece únicamente una opinión. Posiblemente a muchos de nosotros sí que nos parecería correcto.

Pero falta la respuesta de mi Gabinete y del Magistrado. A ambos les pedí un informe sobre el estado actual de las leyes en este tema (fig. 6). En dicho informe se habla de Responsabilidades, Profesionales Sanitarios, Facultativos con formación y experiencia en Biología de la Reproducción y de Directores de URA. Sólo puedo deciros que es positivo hacia nuestra situación profesional actual.

Durante el Congreso de Girona dije que lo ponía a disposición de aquellos que quisieran consultarlo y que el precio de dicho informe era de una cerveza. La propuesta (y el precio) se mantienen. Sólo tenéis que pedírmelo.

REFLEXIONES FINALES

Está claro que cada centro es un mundo, y cada uno de nosotros disfrutamos (o padecemos) distintas condiciones según dónde trabajemos. Y ése creo que es el principal problema. No sabemos claramente cuáles son nuestras competencias y responsabilidades, y así difícilmente podemos hacer respetar nuestro espacio profesional.

Pero aunque aún no tengamos un libro blanco que delimite claramente esas competencias, lo que sí tenemos son leyes y reales decretos suficientemente claros a este respecto. No tenemos una acreditación reconocida. No podemos poner el papel oficial en la pared. Pero a todos los efectos somos Facultativos con formación y experiencia en biología de la reproducción y responsables de la actividad que desarrollamos. Ya habéis visto que en eso coinciden todos. Leyes, sociedades científicas y colegios profesionales. Pero la palabra responsabilidad implica mucho, ya nos

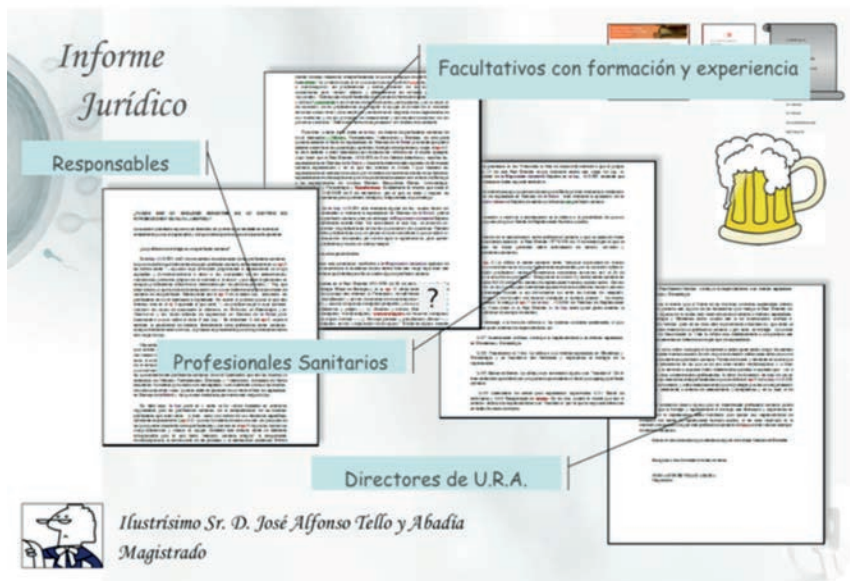


Figura 6

llamemos facultativos o embriólogos clínicos, ya que habla de cosas como "Independencia en la realización del trabajo"... "Responsabilidad en la ejecución"... "Obligatoriedad en la información"... "Firma y documentación de la actividad profesional realizada"...

O sea, no se trata sólo de lo que queremos ser o hacer, como pedíais en la pregunta de la encuesta *¿Qué cambiaríais?*". Hemos pasado a lo que DEBEMOS hacer.

Y esto creo que es muy importante, ya que al hacerlo se conseguiría de forma indirecta varios de los deseos para nuestra profesión mostrados en esta encuesta... mayor contacto con las parejas y que se reconozca la labor que realizamos.

Naturalmente nadie nos puede obligar a hacer lo que no queramos hacer. Incluso podemos no hacerlo. Pero entonces posiblemente no estemos realizando bien nuestro trabajo y no podremos decir que seamos los responsables de esas unidades asistenciales, seremos otra cosa, y en ese caso deberemos buscar otro embriólogo clínico que asuma esa responsabilidad porque desde luego, en base a ley el que no es el responsable es el ginecólogo, aunque alguien opine que "no es lo correcto".

Por ello pido en estas líneas que desde ASEBIR se promueva un debate interno para discutir cuáles creemos que deben de ser nuestras competencias y así poder plantearlas al organismo adecuado cuando llegue el momento de ordenar nuestra profesión (si es que llega) y si no llega, por lo menos, tener todos claro cuál queremos que sea nuestro papel en el campo de la Reproducción Humana Asistida.

EmbryoGen®

New!

The first medium
with rhGM-CSF cytokine

- A new IVF medium for cleavage-stage embryos containing a naturally occurring cytokine
- Supports the natural mother-embryo communication
- A novel treatment option for some of the most challenged patients



CE
0543



origio

a CooperSurgical Company

IMPLICACIONES DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS EN LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

IMPLICATIONS OF THE TELOMERE LENGTH IN THE REPRODUCTIVE BIOLOGY

Mercedes Gallardo

Grupo de Telómeros y Telomerasa, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid.

e-mail: mmgallardo@cnio.es

RESUMEN

Los telómeros de las especies de vida larga se acortan con la edad y la presencia de estos telómeros críticamente cortos inducen una pérdida de la viabilidad celular, que se ha relacionado con una alteración de la función tisular y con la pérdida de capacidades regenerativas, características del envejecimiento. Hoy día sabemos que existen muchas enfermedades y síntomas asociados a un acortamiento telomérico acelerado, como son enfermedades cardiovasculares, del sistema nervioso central (Alzheimer, Parkinson), cáncer, diabetes e infertilidad, por citar algunos ejemplos. Este artículo se centra en la relación entre la longitud de los telómeros y el envejecimiento reproductivo, así como en las consecuencias de este acortamiento en la fertilidad. Asimismo, se muestra su gran potencial como biomarcador en los procesos de fecundación asistida. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(2): 39-44.

Palabras clave: telómeros, telomerasa, envejecimiento, fertilidad.

SUMMARY

Most cells of long-lived species undergo telomere shortening throughout life. Critically short telomeres trigger loss of cell viability in tissues, which has been related to alterations of tissue function and loss of regenerative capabilities in aging. Nowadays, we know about many diseases and syndromes related to an accelerated telomere shortening, as cardiovascular and central nervous system diseases (Alzheimer, Parkinson), cancer, diabetes and infertility, for example. This article presents the relationship between the telomere length and the reproductive aging, and the impact on fertility. It also shows its potential use as a biomarker in assisted fertilization. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2012; 17(2): 39-44.

Key words: telomeres, telomerase, aging, fertility.

¿QUÉ SON LOS TELÓMEROS?

Los telómeros son unas estructuras nucleoproteicas situadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos, de importancia crítica tanto en el mantenimiento de la estabilidad genómica como en los procesos de supresión tumoral y envejecimiento. La función protectora que desempeñan los telómeros fue descrita de forma independiente por Müller (1938) y McClintock (1939), quienes observaron de manera independiente que los cromosomas portaban en sus extremos una estructura especial que les confería estabilidad. Müller acuñó el término de etimología griega “telómeros” para denominar a esas estructuras, “telos” final y “meros” parte (Müller, 1938). Los telómeros ejercen su función protectora de los extremos cromosómicos evitando que estos sean reconocidos,

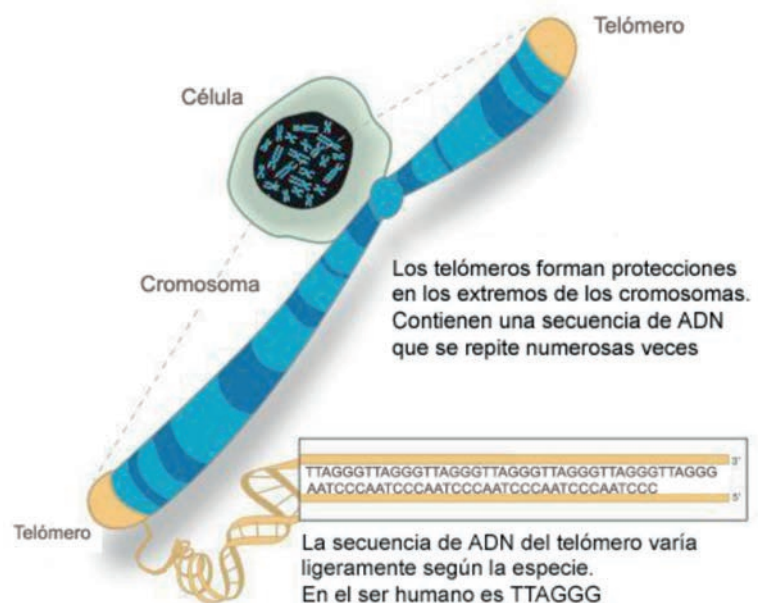


Figura 1. Estructura de los telómeros en humanos



Figura 2. El acortamiento de los telómeros va de la mano del proceso de envejecimiento

y posteriormente procesados, como roturas de la doble hebra del DNA.

En la mayor parte de los eucariotas, los telómeros consisten en repeticiones en tándem de una secuencia rica en guanina (TTAGGG en todos los vertebrados) (Figura 1).

La longitud de los telómeros es variable entre las distintas especies. Mientras que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la longitud de los telómeros está comprendida entre 225 y 375 pb (Zakian, 1996), los telómeros de los humanos tienen una longitud de entre 5-15 kb (de Lange *et al.*, 1990).

Estas diferencias en la longitud media del telómero no afectan a la correcta función telomérica, a menos que los telómeros se acorten por debajo de una longitud crítica, lo cual impediría su correcta función y conduciría a una inestabilidad genómica (Blasco *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998).

En ausencia de un mecanismo compensatorio, los telómeros se acortan progresivamente con cada división celular debido al denominado problema de la replicación de los extremos del DNA lineal (Olovnikov, 1971; Watson, 1972). Existen, además, otros factores como la acción de las nucleasas y la de los radicales libres de oxígeno (ROS), que contribuyen al acortamiento telomérico con cada ciclo celular (Makarov *et al.*, 1997; Sfeir *et al.*, 2005; Wellinger *et al.*, 1996; Ramirez *et al.*, 2003; Sitte *et al.*, 1998). El acortamiento telomérico originado por ROS se reduce con el uso de agentes antioxidantes (von Zglinicki *et al.*, 2000).

En la especie humana, como en la mayor parte de las especies de vida larga, los telómeros de todas las células se acortan en mayor o menor medida con la edad, llegando a una longitud crítica tras un determinado número de divisiones celulares (Harley *et al.*, 1990). Los telómeros críticamente cortos inducen una pérdida de viabilidad celular, que

está relacionada con la pérdida de potencial regenerativo de los diferentes tejidos (Flores *et al.*, 2006; von Zglinicki *et al.*, 2005). De esta manera, el acortamiento de los telómeros con cada división celular convierte a la longitud telomérica en un "reloj molecular" del envejecimiento del organismo (Figura 2) (Blackburn, 2001; Collins and Mitchell, 2002) y por lo tanto en un importante biomarcador de la edad biológica con múltiples aplicaciones clínicas.

LA TELOMERASA

El principal mecanismo para mantener la longitud de los telómeros es la telomerasa, una ribonucleoproteína que alarga los telómeros en aquellas células que la expresan. La telomerasa se activa durante la embriogénesis. De hecho, espermatozoide y ovocitos maduros no tienen actividad telomerasa, y es justo después de la fecundación y a lo largo de toda la gestación cuando se detectan altos niveles de actividad telomerasa, persistiendo durante gran parte del desarrollo fetal y protegiendo a los telómeros de un acortamiento significativo en este periodo de elevada tasa de expansión celular (Blasco *et al.*, 1995; Ulaner and Giudice, 1997; Wright *et al.*, 2001). La actividad telomerasa, no obstante, se silencia tras el nacimiento en la mayor parte de los tejidos somáticos y, como

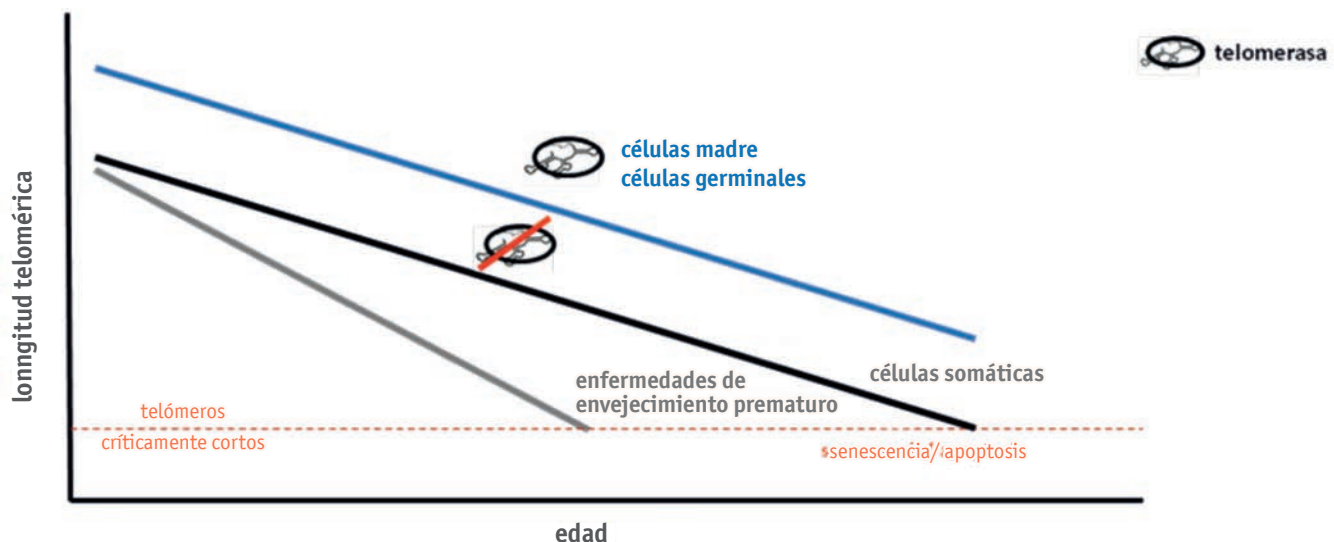


Figura 3. Relación esquemática entre la longitud del telómero y los procesos de envejecimiento. La pendiente de las rectas de acortamiento telomérico con la edad representa la velocidad de acortamiento. La velocidad de acortamiento con la edad es mayor en las enfermedades de envejecimiento prematuro.

consecuencia, el nacimiento marca el inicio del acortamiento telomérico en la mayor parte de los tejidos a lo largo de la vida. Los tejidos proliferativos de alto potencial regenerativo como son la médula ósea, la piel y el tracto intestinal, así como los linfocitos activados, expresan una actividad telomerasa moderada (Forsyth *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1999). Asimismo, las células madre también expresan telomerasa (Bachor *et al.*, 1999; Ramirez *et al.*, 1997; Yui *et al.*, 1998). De igual manera, la mayor parte de los tumores malignos y las líneas celulares derivadas tienen una actividad telomerasa muy elevada (Hiyama *et al.*, 1996; Kyo *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997).

En la especie humana, tres son los factores que contribuyen a la mortalidad celular dependiente de los telómeros: la represión de la actividad telomerasa en la mayoría de los tejidos somáticos tras el nacimiento (Ulaner *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1996), los telómeros relativamente cortos en el nacimiento y a lo largo de la vida (Kakuo *et al.*, 1999; Okuda *et al.*, 2002) y la actividad telomerasa muy regulada en las células madre (Bodnar *et al.*, 1996; Broccoli *et al.*, 1995). Estos factores, junto con el acortamiento inherente a la división celular, confieren a las células una capacidad de división finita. Se ha descrito un acortamiento telomérico con la edad en células mononucleares de sangre periférica (Canela *et al.*, 2007; Iwama *et al.*, 1998) y en la mayor parte de tejidos de humanos y ratón (Figura 3) (Flores *et al.*, 2008; Hastie *et al.*, 1990).

La velocidad de acortamiento telomérico con la edad se puede acelerar por factores de riesgo para ciertas enfermedades, como el estrés psicológico, la obesidad, el tabaquismo o el estatus socioeconómico (Cawthon *et al.*, 2003; Cherkas *et al.*, 2006; Epel *et al.*, 2004; Valdes *et al.*, 2005). Recientemente se ha publicado que individuos jóvenes que han sido sometidos a un estrés intrauterino, presentan telómeros significativamente más cortos (Figura 4) (Entringer *et al.*, 2011). Las consecuencias clínicas de este descubrimiento son tremendamente importantes, ya que el envejecimiento

celular podría estar influenciado por el estrés prenatal, incrementando así la susceptibilidad de estos individuos a padecer serias enfermedades asociadas al envejecimiento.

La longitud telomérica en los individuos de una misma edad en una población presenta variabilidad debida a factores genéticos y ambientales. Numerosos estudios realizados en poblaciones humanas han descrito una correlación entre determinadas enfermedades asociadas a la edad, como las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad de Alzheimer (Ogami *et al.*, 2004; Panossian *et al.*, 2003), y la presencia de telómeros más cortos en los individuos que las padecen respecto de los individuos control. Esta fuerte relación entre telómeros cortos y enfermedades asociadas al envejecimiento, convierte la longitud telomérica en un biomarcador de envejecimiento muy poderoso. Se ha descrito un acortamiento telomérico con la edad en células mononucleares de sangre periférica (Canela *et al.*, 2007; Iwama *et al.*, 1998) y esto hace que los leucocitos sean el tipo celular más idóneo para medir el acortamiento telomérico a lo largo de la vida del

organismo, ya que proliferan durante toda la vida de éste y son, además, de fácil obtención mediante una simple extracción de sangre.

Por otra parte, el acortamiento de los telómeros es más acelerado en hombres que en mujeres (Benetos *et al.*, 2001) y este hecho es consistente con una mayor mortalidad vista en los varones, así como una mayor variabilidad en la capacidad reproductiva en hombres que en mujeres. Los estrógenos podrían explicar esta diferencia en la tasa de acortamiento entre hombres y mujeres: tienen un efecto antioxidante y son capaces de estimular la expresión de la telomerasa (Demerath *et al.*, 2004).

EL EFECTO PATERNAL EN LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS

En los años 80s se describió por primera vez que el esperma tiene los telómeros más largos que los leucocitos del mismo individuo (Cooke and Smith, 1986). Y posteriormente, en los 90s, distintos estudios mostraron que, de hecho, la longitud de los telómeros en el esperma aumenta a medida que aumenta la edad del donante (Allsopp *et al.*, 1992). Como consecuencia, la descendencia de

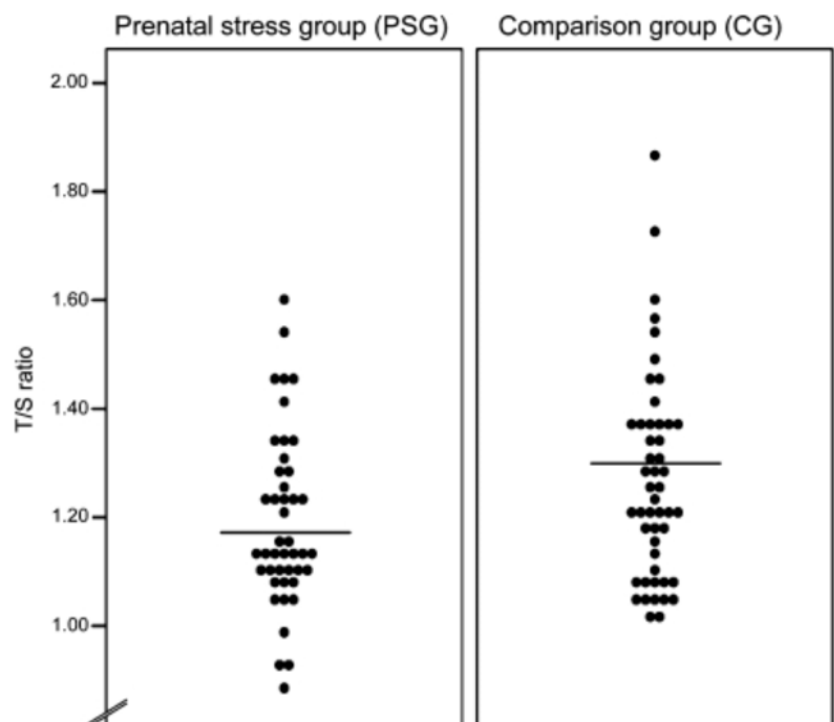


Figura 4. Representación de longitudes teloméricas en individuos sometidos a estrés prenatal (PSG) e individuos control (CG). Las líneas indican las medias de cada grupo estudiado.

hombres mayores tienen telómeros más largos (De Meyer *et al.*, 2007). Con la madre parece no ocurrir lo mismo; no se ha encontrado ninguna correlación entre la edad de la madre y la longitud de los telómeros de la descendencia (Kimura *et al.*, 2008). Esta elongación de la longitud telomérica en el esperma se podría explicar por la necesidad de producir gametos masculinos a lo largo de toda la vida, mientras que las mujeres tienen ya todos los gametos producidos desde el nacimiento (Keefe *et al.*, 2007).

TELÓMEROS Y FERTILIDAD

Existen distintos estudios que correlacionan, positivamente, la longevidad en humanos con una mayor fecundidad, una reproducción a una edad más avanzada (Doblammer, 2000) y la aparición de la menopausia a edades más tardías (Jacobsen *et al.*, 1999). El retraso en la aparición de la menopausia en mujeres más longevas podría deberse, entre otras razones, a un envejecimiento celular más lento (Perls *et al.*, 2001). Y esto ha llevado a muchos investigadores a pensar en el papel de los telómeros en el envejecimiento reproductivo, por la relación existente entre telómeros y envejecimiento celular. De modo que uno podría pensar que mujeres que presentan un envejecimiento reproductivo prematuro tendrían telómeros más cortos. Hanna *et al.* (2009), comparan un grupo de mujeres con envejecimiento reproductivo prematuro (RM) (mujeres que han sufrido abortos recurrentes) con un grupo de mujeres control (mujeres mayores de 37 años que han tenido un embarazo sano y sin ningún historial de abortos) y ven que, efectivamente, las primeras (RM) tienen telómeros más cortos.

Conocido es que la fertilidad en las mujeres decae con el paso del tiempo. Esto es debido al efecto combinado de un descenso en la tasa de concepción y en un incremento en la tasa de abortos. Los procesos biológicos que, principalmente, contribuyen al envejecimiento del ovario y por tanto a la infertilidad en las mujeres son: una disminución en el número de folículos (insuficiencia ovárica) y un aumento de la estabilidad genómica asociada a la aparición de aneuploidías (Faddy, 2000).

A. INSUFICIENCIA OVÁRICA.

Recientemente se ha descrito una relación entre longitud telomérica y la insuficiencia ovárica, fenómeno caracterizado por una disminución en el número inicial de folículos así como un aumento en la destrucción de los mismos y una débil respuesta folicular a la estimulación por gonadotropinas (Butts *et al.*, 2009). Una de las principales consecuencias de este síndrome, es una reducida fecundidad. En humanos, se ha demostrado la presencia de actividad telomerasa en embriones (Liu *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 1996). Un trabajo realizado en folículos bovinos ha puesto también de manifiesto la existencia de actividad telomerasa en las células de la granulosa, necesarias para la formación de los folículos (Lavranos *et al.*, 1999). Pues bien, se ha demostrado que mujeres con problemas de insuficiencia ovárica tienen células de la granulosa con telómeros más cortos, coincidiendo con una capacidad proliferativa limitada de dichas células (Tabla I). La ausencia de actividad de la telomerasa podría explicar ambos hechos: erosión de los telómeros acelerada y capacidad replicativa limitada, ya que una activación insuficiente de la telomerasa en estadios tempranos del desarrollo del folículo pondría en compromiso las funciones celulares necesarias para la correcta maduración del folículo.

	Longitud telomérica $\pm$ SEM	No actividad telomerasa (%)
Insuficiencia ovárica (n=12)	1.88 $\pm$ 0.69	92
Controles (n=42)	3.15 $\pm$ 0.25	50

Tabla I. Longitud telomérica (medida por Q-PCR) y actividad telomerasa en células de la granulosa en mujeres con insuficiencia ovárica vs controles.

Pero, ¿cómo afecta la disminución de la actividad telomerasa y el acortamiento telomérico en los resultados de FIV? Existe una relación significativa entre ausencia de actividad telomerasa y número de folículos producidos. Otros parámetros analizados (nº de ovocitos recuperados, % de fecundación, tasa de embarazo, etc.) muestran una tendencia negativa en los casos de ausencia de actividad de la telomerasa, pero dicha

asociación no es significativa (Butts *et al.*, 2009). Estas observaciones abren la posibilidad de usar la longitud telomérica como un marcador de la disfunción de las células de la granulosa, de la insuficiencia ovárica y por tanto del éxito reproductivo de una mujer.

B. ANEUPLOIDÍAS

La mayoría de los ovocitos y embriones que han sufrido algún tipo de aneuploidía entran en apoptosis antes de implantarse, pero algunos consiguen escapar de la muerte celular programada y acaban en abortos o generando descendencia con alteraciones cromosómicas. Una de las principales causas de la generación de aneuploidías en el ovocito durante la meiosis en la madre, es la disfunción telomérica (Keefe *et al.*, 2006), ya que los telómeros tienen un papel muy importante al comienzo de la meiosis, facilitando el alineamiento, sinapsis y formación de quiasmas (Scherthan, 2006). Recientemente, se ha demostrado que la longitud de los telómeros está asociada con el desarrollo de aneuploidías en humanos (Treff *et al.*, 2011). ¿Se podría, pues, utilizar la longitud telomérica como “predictor” de disfunciones meióticas y por lo tanto de la posibilidad de embarazo tras un tratamiento de FIV? Hay estudios que sugieren que sí (Keefe *et al.*, 2007). Los telómeros de pacientes que se quedaron

embarazadas después de un tratamiento por FIV resultaron ser más largos que en aquellas mujeres que no consiguieron quedarse embarazadas (Figura 5).

CONCLUSIONES

Cada vez tenemos más evidencias de las implicaciones biológicas que supone el acortamiento de los telómeros, y lo que es más importante, de sus consecuencias

clínicas. El gran potencial que tiene como biomarcador de la salud en general y de muchas enfermedades y síndromes concretos, en áreas muy distintas de la medicina, hace que se considere como un importante factor en el ámbito de la medicina personalizada, incluyendo la medicina reproductiva, ayudando a diseñar tratamientos personalizados y por tanto más eficaces y con menos efectos secundarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allsopp et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(21):10114-10118.

Bachor et al. Telomerase is active in normal gastrointestinal mucosa and not up-regulated in precancerous lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(8-9):453-460.

Benetos et al. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 2001; 37(2 Part 2):381-385.

Bodnar et al. Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 1996; 228(1):58-64.

Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106(6):661-673.

Blasco et al. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 1995; 269(5228):1267-1270.

Blasco et al. Mouse models to the study of telomerase. *Ciba Found Symp* 1997; 211:160-170; discussion 166-170.

Broccoli et al. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(20):9082-9086.

Butts et al. Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(12):4835-43.

Canela et al. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(13):5300-5305.

Cawthon et al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years and older. *Lancet* 2003; 361 (9355):393-395.

Cherkas et al. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell* 2006; 5(5):361-365.

Collins and Mitchell. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; 21(4):564-579.

Cooke and Smith. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51(1):213-219.

De Lange et al. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Bio* 1990; 10(2):518-527.

Demerath et al. Telomeres and telomerase in the fetal origins of cardiovascular disease: a review. *Hum Biol* 2004; 76(1):127-146.

De Meyer et al. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum Mol Genet* 2007; 16(24):3097-102.

Doblhammer G. Reproductive history and mortality later in life: a comparative study of England and Wales and Austria. *Popul Stud (Camb)* 2000; 54(2):169-76.

Entringer et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(33):513-518.

Epel et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(49):17312-17315.

Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163(1-2):43-48.

Flores et al. Telomerase regulation and stem cell behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18(3):254-260.

Flores et al. The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 2008; 22(5):654-667.

Forsyth et al. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 2002; 69(4-5):188-197.

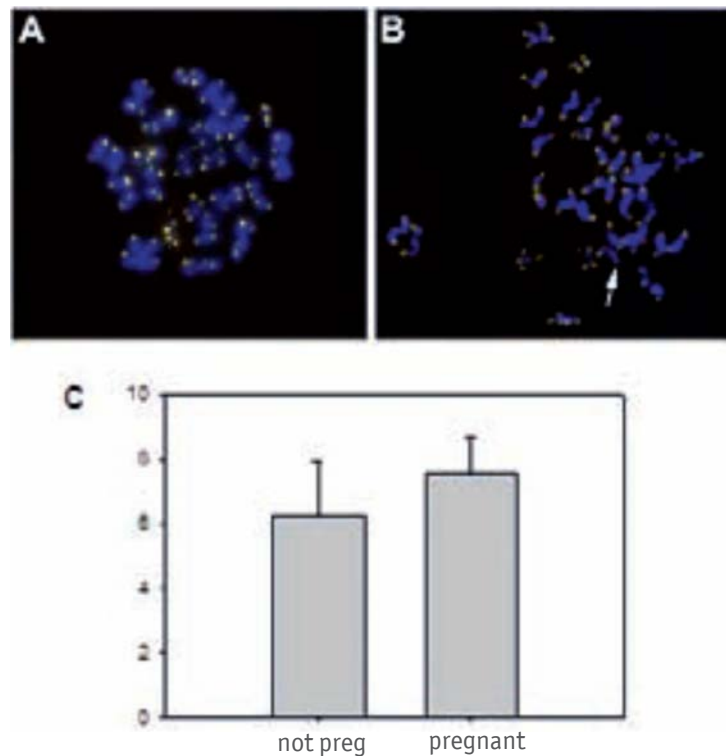
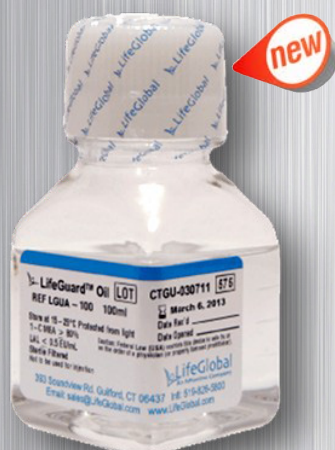


Figura 5. Telómeros en ovocitos humanos. **A.** Telómeros normales asociados a embarazo. **B.** Cromosomas con telómeros cortos de un embarazo fallido. **C.** Longitud de telómeros en mujeres no embarazadas (not preg) vs mujeres embarazadas (pregnant).

- Hanna et al. Telomere length and reproductive aging. *Hum Reprod* 2009; 24(5):1206-11.
- Harley et al. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345(6274):458-460.
- Hastie et al. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346(6287):866-868.
- Hiyama et al. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(2):116-122.
- Iwama et al. Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 1998;102(4):397-402.
- Jacobsen et al. Age at natural menopause and total mortality and mortality from ischemic heart disease: the Adventist Health Study. *J Clin Epidemiol* 1999; 52(4):303-307.
- Kakuo et al. Human is a unique species among primates in terms of telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(2):308-314.
- Keefe et al. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18(3):280-285.
- Keefe et al., Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(2):139-143.
- Kimura et al. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet* 2008; 4(2):37.
- Kyo et al. Telomerase activity in human urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 1997; 107(5):555-560.
- Lavranos et al. Evidence for ovarian granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles. *Biol Reprod* 1999; 61(2):358-366.
- Lee et al. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998; 392(6676):569-574.
- Lin et al. Telomerase activity in primary prostate cancer. *J Urol* 1997; 157(3):1161-1165.
- Liu et al. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(9):5147-5152.
- Liu et al. Telomere, telomerase and aging. *Mech Ageing Dev* 2007; 129(1-2):1-2.
- Makarov et al. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997; 88(5):657-666.
- McClintock B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* (1941) 26(2):234-282.
- Müller HJ. Bar duplication. *Collecting Net (Woods Hole)* 1938;13:183-198.
- Ogami et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(3):546-550.
- Olovnikov AM. Principel of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1971; 201(6):1496-1499.
- Okuda et al. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res* 2002; 52(3):377-381.
- Panosian et al. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol Aging* 2003; 24(1):77-84.
- Perls et al. The evolution of menopause and human life span. *Ann Hum Biol* 2001; 28(3):237-245.
- Ramirez et al. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol* 1997; 108(1):113-117.
- Ramirez et al. Massive telomere loss is an early event of DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278(2):836-842.
- Scherthan H. Factors directing telomere dynamics in synaptic meiosis. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(4):550-553.
- Sfeir et al. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol Cell* 2005; 18(1):131-138.
- Sitte et al. Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(6):885-893.
- Treff et al. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 2011; 7(6):1002161.
- Ulaner et al. Telomerase activity in human fetal tissues during gestation. *Mol Hum Reprod* 1998; 3(9):769-773.
- Valdes et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005; 366 (9486):662-664.
- von Zglinicki et al. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(1):64-74.
- von Zglinicki et al. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med* 2005; 5(2):197-203.
- Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Bio* 1972; 239(94):197-201.
- Wellinger et al. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 1996; 85(3):423-433.
- Wright et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18(2):173-179.
- Wright et al. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 2001; 7(10):947-955.
- Yui et al. Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood* 1998; 91(9):3255-3262.
- Zakian VA. Telomere functions: lessons from yeast. *Trends Cell Biol* 1996; 6(1):29-33.



★ **LifeGuard™**
Aceite mineral de alta viscosidad



Global Total™ suplementado con Albúmina enriquecida con α y β Globulinas



★ **Lite Oil™**
Aceite mineral

★ Nuestros Aceites han sido sometidos, a procedimientos de filtración a través de membrana, de acuerdo a la normativa de esterilidad:
Endotoxina (LAL, ≤ 0.5 EU/ml) Test Esterilidad: Negativo MEA > 80%



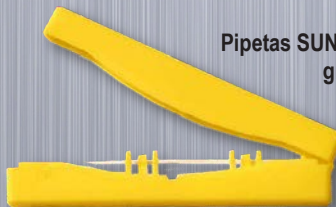
Sistema S3 para la Vitricación de Blastocistos Humanos:

- No contiene DMSO
- Glicerol y Etileno Glicol, como Crioprotectores. Global w/ Hepes, como medio base
- Sistema de sellado cerrado, con pajuelas convencionales

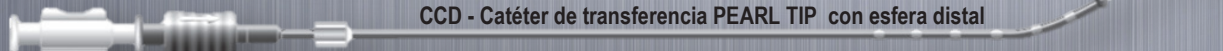
CCD - Aguja OPS de punción de ovocitos



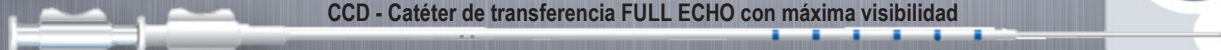
Pipetas SUNLIGHT USA para ICSI en todas las graduaciones y modelos



CCD - Catéter de transferencia PEARL TIP con esfera distal



CCD - Catéter de transferencia FULL ECHO con máxima visibilidad



Cross section view:
2 echogenic lines included
in the transparent catheter wall
(Patented technology)



MATERIAL CONSUMIBLE

Y TODO EL EQUIPAMIENTO NECESARIO PARA EL LABORATORIO FIV

www.socialfreezing.org · Telf.: 913 771 423

www.civtecongress.com

www.humanrep2013.com

www.eshre.eu/ESHRE/English/Annual-meeting/London-2013/page.aspx/1541

www.asrm.org/IFFS-ASRM2013

www.asebir.com/es/actividad-asebir/actividades/congresos/vii-congreso-sevilla-2013

20º ANIVERSARIO DE ASEBIR

Se acerca el 20º Aniversario de nuestra Sociedad, y el Comité Organizador de los Actos de celebración está preparando una serie de actividades para conmemorar esta fecha.

ASEBIR se creó en 1993 con la finalidad de agrupar a todos los profesionales del ámbito de la Biología de la Reproducción, tanto en la aplicación clínica como en la investigación básica, y para la celebración de este aniversario especial se está preparando la edición de un pequeño libro y de un vídeo.

Para esto, necesitamos de la colaboración de todos nuestros socios, sobre todo de aquellos que llevan muchos años en nuestra sociedad y pueden tener material gráfico que podamos utilizar para este propósito.

Necesitamos que este material sea enviado a nuestra secretaría, a la atención de Mª José Prieto, antes del 31 de enero

de 2013, por correo electrónico, en pdf, o por correo postal si así lo preferís, con el compromiso de devolveros dicho material una vez escaneado o editado.

Os lo agradecemos y disfrutaremos de esta efeméride en nuestro próximo congreso en Sevilla.

CERTIFICACIÓN ASEBIR

Os recordamos que está abierta la 2ª Convocatoria para la Certificación ASEBIR en Reproducción Asistida Humana. Embriología Clínica.

Las dos vías disponibles actualmente son:

- Certificación ASEBIR Vía Rápida
- Certificación ASEBIR Vía Mediante Examen

El plazo de admisión de solicitudes finalizará el 29 de marzo de 2013.

Pueden consultar los detalles de la convocatoria en nuestra web www.asebir.com en el apartado:

www.asebir.com/documentos/archivos/certificado-asebir-informacion-general.pdf

AULA EMB-ASEBIR

El Aula EMB-ASEBIR, ubicada en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) en Cáceres, continúa con su trayecto exitoso. Recientemente se realizaron el I Practicum ASEBIR de Microinyección Intracitoplasmática y el I Practicum ASEBIR de Vitricificación, ambos con un éxito rotundo de asistencia y satisfacción por parte del alumnado. Como muestra de las posibilidades del Aula EMB-ASEBIR, en el Practicum de Vitricificación se realizó el colapso de blastocistos de ratón mediante laser, una técnica que podría ser relevante para el éxito de este procedimiento (ver artículo de Y. Franco en este número de la revista). Al cierre de esta edición de la Revista ASEBIR, se está ultimando los detalles para la realización del curso de congelación de semen y gestión del banco de donantes, a realizarse en febrero 2013.



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

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. 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. *Spermatogenesis*. 2º ed. Londres: Delmar Publishers; 1996.

D) CAPÍTULO DE LIBRO:

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

E) COMUNICACIÓN A CONGRESO:

Bengston S, 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.

Soluciones que van allá

Oferta exclusiva para
Colegiados



UN SEGURO DE AUTO DISEÑADO PARA TI⁽¹⁾

Más allá de un seguro de auto...
Disfrutarás de las máximas coberturas que
te ofrece el mercado a un precio exclusivo.

Además, tendrás coberturas

EXTRA PARA COLEGIADOS

- En los casos de **robo de maletas y ropa de vestir de uso personal**, siempre que se produzcan en el interior del vehículo y en el transcurso de un viaje fuera de la población de residencia habitual, la Compañía indemniza al asegurado hasta un máximo de **300 €**.

En caso de reparación por siniestro, ya sea con
seguro a terceros o todo riesgo, disfrutarás de
estos servicios totalmente gratuitos en una red
de más de 800 Talleres Colaboradores⁽²⁾

- **Recogida y entrega de tu coche** en el lugar que desees (distancia máxima a confirmar por el taller).
- Ampliación de la garantía de post-reparación de la carrocería a 6 meses.
- **Coche de cortesía**, según disponibilidad del taller, mientras dure la reparación.
- Limpieza del coche, revisión de líquidos, faros y neumáticos.

Llama ahora al
944 354 600
e infórmate

Teléfono exclusivo para
Colegiados comercializado
por SegurMec



CORREDURÍA DE SEGUROS, S.L.
Nº Registro DGSPF J-1.281 Concertado Seguro
de R.C. y de Caución conforme a la Ley 26/2006

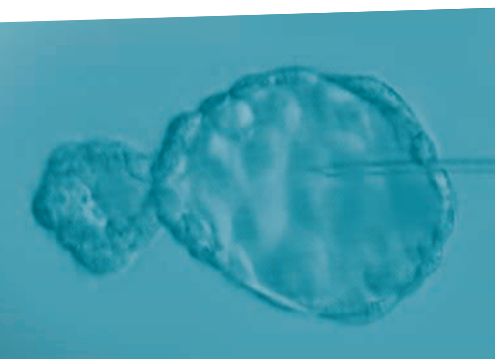
ASEBIR
Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción



El seguro de auto ofrecido es el resultado del asesoramiento independiente y objetivo prestado por SEGURMEC, Correduría de Seguros S.L., quien entre seguros del mismo tipo de distintas entidades aseguradoras ha propuesto los que según su criterio profesional mejor se adaptan a los colegiados.

(1) Aseguradora: Zurich Insurance plc. Sucursal en España. Coberturas sujetas a lo indicado en las condiciones generales y particulares de la póliza.

(2) Los servicios son ofrecidos por la Red de Talleres Colaboradores Zurich. Para más información visita www.zurich.es/seguro/areadeclientes/siniestros/siniestros-coche/talleres.htm



REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ASEBİR

asebir@asebir.com | www.asebir.com