

REVISTA

ASEBIR

Actualidad

- Comentarios Sobre el Real Decreto 1301/2006 de 10 de Noviembre de 2006 Sobre Células y Tejidos Humanos

Artículos

- Efecto de la Eclosión Asistida en Relación al Porcentaje de Gestación en Embriones Criopreservados
- Biopsia Embrionaria
“ Aspectos Técnicos”

Debates

- La FIV Convencional Goza de Buena Salud
- FIV versus ICSI ¿Se Usan de Manera Racional?
- Guías de Práctica Clínica y Diagnóstico Genético Preimplantatorio
- ¿Se Esta Aplicando el DGP de Forma Abusiva?
- ¿Qué le Ocorre a la FIV Convencional Hoy en Dia?

Formación Continuada

- Papel de la Interacción Celular en Foliculogenesis

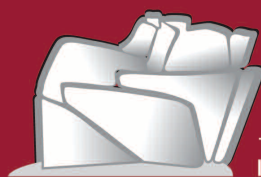
Noticias

Agenda

Boletín de Inscripción

IV CONGRESO ASEBIR

21 AL 23 DE NOVIEMBRE DE 2007
BILBAO. PALACIO EUSKALDUNA



ASEBIR
IV CONGRESO
BILBAO 2007

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO
DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

VITRIFICACIÓN

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

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



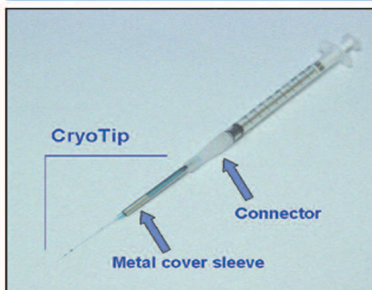
VIT KIT-FREEZE:

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



VIT KIT-THAW:

DESVITRIFICACIÓN: 15 min



CRYOTIPS™:

sistema herméticamente cerrado de
 conservación de muestras: pajuela termosellada

Publicaciones recientes:

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

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

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

ASEBIR

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

SUMARIO

Pág.

EDITORIAL	5
------------------------	---

M. Grossmann

ACTUALIDAD

Comentarios sobre el Real Decreto 1301/2006 de 10 de noviembre de 2006 sobre células y tejidos humanos.	6
--	---

J. Ten, F. Compañ, A. Montoya, R. Bernabeu

ARTÍCULOS

Efecto de la eclosión asistida en relación al porcentaje de gestación en embriones criopreservados.	12
--	----

M. Dorado, M. Hebles, B. Migueles, M. González, P. Sánchez, F. Sánchez

Biopsia Embrionaria "Aspectos Técnicos"	17
--	----

J.M. Moreno

AULA JOVEN

Introducción a aula joven	23
Estudio del efecto de prolongar 1 hora el tiempo de incubación en la técnica de swim-up	23

N. Alcañiz, I. Solvas, M. Grossmann, F. Vidal, MC. Pons

PROGRAMA CONGRESO	28
--------------------------------	----

DEBATES

Introducción a debate	34
------------------------------------	----

La FIV convencional goza de buena salud	34
--	----

J. Cuadros, P. Sánchez - Aparicio, L. Andrés, M. Sánchez de Burgos.

FIV versus ICSI ¿se usan de manera racional?	35
---	----

C. Ochoa

¿Qué le ocurre a la FIV convencional hoy en día?	36
---	----

MC. Pons, M. Grossmann.

Guías de práctica clínica y diagnóstico genético preimplantacional	37
---	----

MC. Gonzalvo, A. Clavero, S. Calderón, A. Sánchez - León, ML. Pérez,

ML. González, A. Alonso, JA. Castillo

¿Se esta aplicando el DGP de forma abusiva?	38
--	----

F. Vidal

FORMACIÓN CONTINUADA

Papel de la Interacción celular en foliculogénesis	41
---	----

P. Sánchez- Aparicio, R. Ramos, J. Cuadros.

NOTICIAS

Convocatoria Asebir 07	51
-------------------------------------	----

AGENDA	52
---------------------	----

BOLETÍN DE INSCRIPCIÓN	54
-------------------------------------	----

IMAGEN DE PORTADA:

Cartel anunciador del IV Congreso ASEBIR en Bilbao.

Vol. 12 • Nº 1 • Junio 2007

EDITA.

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

JUNTA DIRECTIVA.

Presidente: Antonio L. González-Utor

Vicepresidenta: Carmen Ochoa

Secretaria: Begoña Arán

Tesorero: Manuel Ardoy

Vocales: Nieves Cremades, Mark

Grossmann, M^a Victoria Hurtado de

Mendoza, Jorge Cuadros, Juan Manuel

Moreno, M^a José de los Santos,

Fernando Marina y Jorge Ten.

COORDINACIÓN

DE LA REVISTA.

Nieves Cremades

Mark Grossmann

M^a Victoria Hurtado de Mendoza

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES.

ASEBIR

Secretaría ASEBIR:

c/ Cronos , nº 20, Bloque 4, 1º, 6

28037 Madrid

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

E-mail: asebir@asebir.com

DISEÑO, MAQUETACIÓN e IMPRESIÓN.

RECCO Imagen y Desarrollo, S.L.L.

c/ Albarracín, 56 - 28037 Madrid

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

E-mail: recco@recco-sll.com

Depósito Legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

Soporte Válido: 78-R-CM

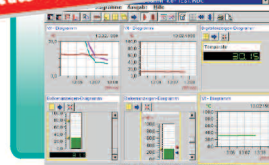
Instrumentación para FECUNDACIÓN IN VITRO

Incubadores de CO₂:

Heracell 150/240

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

Data Control opcional



Cabinas de flujo laminar para FIV:

Sterile SS / Al

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

Cabina con
preparación para
**FECUNDACIÓN
IN VITRO**



Centrífugas:

Multifuge 1

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

Centrífuga
Multifuge I



Autoclaves:

Systec

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

Autoclaves



Otros equipos relacionados



Baños



Balanzas
analíticas



Agitadores



Conservadores +4°C
Congeladores -85°C
Cryoconservadores -150°C



Estufas de cultivo /
secado / esterilización



Mobiliario
técnico de
laboratorio

Controltecnica Instrumentación Científica S.L.

C/ Artesanos, 7 (Prado del Espino)

Tel. 902 431 408

BARCELONA: 93 486 46 60

VALENCIA: 679 20 85 37

LA RIOJA: 648 09 27 09

www.controltecnica.com

28660 Boadilla - Madrid

Fax. 91 729 44 54

ANDALUCÍA: 679 21 02 33

618 73 78 48

MURCIA: 686 93 68 31

SORVALL®
Heraeus

CONTROLTECNICA
instruments

Proceso ESHRE de certificación en embriología clínica

Desde la Junta Directiva trabajamos duro para consolidar ASEBIR como sociedad de referencia en los campos de la embriología clínica y la biología de la reproducción.

Y un paso más en esta tarea es nuestra participación desde buen comienzo en el proceso de certificación individual en embriología clínica a nivel europeo y que ESHRE, con la colaboración de organizaciones locales como ASEBIR, ha iniciado recientemente.

De entrada, de modo retrospectivo y de forma excepcional, ESHRE certificará como “embriólogos/as clínicos/as sénior jefe de laboratorio” a las personas que cumplan los requisitos planteados (licenciatura + 10 años de experiencia + master y/o doctorado + cargo de jefe/director de laboratorio) y que presenten candidatura antes del 31 de Octubre de 2007 según el modelo publicado en la Web de ESHRE/accreditation y en la Web ASEBIR. La lista de personas certificadas se publicará al menos en la Web de ESHRE y se pretende que ellos/ellas sirvan de base, y a su vez puedan avalar la suficiencia de otros, en el largo camino de las certificaciones europeas.

Más adelante ESHRE certificará el resto de profesionales que lo deseen (hay voluntad de que este reconocimiento, a medio plazo, se convierta en obligatorio) en dos niveles, uno superior o de “embriólogo clínico sénior” y uno de básico o de “embriólogo clínico” mediante exámenes tipo test y de la presentación de un currículum contrastado.

La primera convocatoria de exámenes está prevista durante el congreso de ESHRE de Barcelona 2008, se abrirá únicamente a aquellos candidatos que postulen al nivel superior de “embriólogo/a clínico/a sénior”.

Y en el horizonte del año 2009 está previsto que se convoquen, al menos una vez cada año, exámenes para los dos niveles acreditativos mencionados ¡Todo un reto!

Evidentemente la información de este importante proceso se publicará con suficiente antelación en la Web de ESHRE, y ASEBIR dará cuenta de ella inmediatamente.

Aunque esta certificación es voluntaria y, por ahora, carece de respaldo del ejecutivo comunitario, creemos que es un paso de gigante para conseguir el reconocimiento de la especialidad en embriología clínica y esperamos poder comentarla en nuestro congreso.

¡Nos vemos en Bilbao!

Mark Grossmann i Camps, Presidente Electo

COMENTARIOS SOBRE EL REAL DECRETO 1301/2006 DE 10 DE NOVIEMBRE DE 2006 SOBRE CÉLULAS Y TEJIDOS HUMANOS

Jorge Ten, Francisco Compañ, Alejandro Montoya, Rafael Bernabeu

Instituto Bernabeu, Alicante

En este Real Decreto (RD) se establecen las normas para todas las actividades relacionadas con la utilización de células, tejidos humanos y derivados, destinados a ser aplicados en el ser humano. El objetivo es claro, ya que trata de asegurar la calidad y la seguridad de las células y tejidos utilizados para evitar la transmisión de enfermedades y facilitar su uso terapéutico. Está enfocado básicamente a la regulación de los trasplantes de células y tejidos humanos, siguiendo los principios de voluntariedad, anonimato, altruismo y solidaridad que caracterizan el modelo de trasplantes del Sistema Nacional de Salud. No obstante, también se incluyen las células reproductoras y, por tanto, las implicaciones en nuestra área de trabajo son evidentes. El plazo de adaptación para los centros autorizados es de 12 meses desde la entrada en vigor el pasado 11 de noviembre de 2006.

Las actividades reguladas en este RD incluyen la donación, obtención, evaluación, procesamiento, preservación, almacenamiento, distribución, aplicación e investigación clínica de las células y/o tejidos, existiendo una **trazabilidad** en cada uno de estos procesos. Dicha trazabilidad incluye la ubicación, localización e identificación de las células y/o tejidos hasta que llegan al receptor o son desestimados y/o destruidos. Asimismo, cubre la capacidad de localizar e identificar cualquier dato relevante de los productos y materiales que van a estar en contacto directo con las células y/o tejidos y que puedan afectar a la calidad y seguridad de los mismos.

Mediante este RD, tal y como menciona la Disposición Final Segunda, se incorporan al ordenamiento jurídico español tanto la Directiva Europea 2004/23/CE relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad

para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos, como la Directiva Europea 2006/17/CE de la Comisión por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos.

¿Cómo nos afecta este RD a los centros de reproducción asistida? ¿Existe alguna medida que debemos adoptar? Estas y otras preguntas son las que nos hicimos en el momento de conocer su aparición y son las que vamos a comentar en este artículo. No obstante, como embriólogos y clínicos, no somos precisamente las personas más apropiadas para realizar este tipo de tareas que casi siempre nos resultan farragosas. Evidentemente, los cambios constantes en la legislación que regula nuestra área de trabajo hacen que sea inevitable un estudio a fondo de la misma. Por suerte, en los últimos años se están creando equipos jurídicos y consultivos que nos están ayudando enormemente en las dudas que siempre nos pueden surgir durante la praxis. Sin ir más lejos, en nuestra página web (www.asebir.com) creamos recientemente un servicio gratuito de Asesoría Jurídica en el que hemos recibido numerosas consultas que han sido contestadas y aclaradas. Sin duda, el análisis exhaustivo de este RD nos plantea algunas incógnitas que solamente pueden ser solucionadas por estos profesionales jurídicos. A continuación pasaremos a describir los aspectos más importantes de los 6 Capítulos y los 8 Anexos de los que consta este RD, centrándonos en los puntos que implican fundamentalmente a la donación de gametos. Para un estudio más detallado, se puede consultar este RD en www.boe.es con el número 270 y pági-

nas 39475 a 39502.

El **Capítulo I** hace mención a las disposiciones generales, y son varios los puntos a tener en cuenta. De entrada, el Artículo 1 contempla que este RD tiene **aplicación a las células reproductoras en todo lo no previsto en la Ley 14/2006**, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Por tanto, esto nos obliga a conocer en profundidad la Ley y el RD. Un aspecto importante es la definición que se hace de células reproductoras en el Artículo 2, donde se incluyen aquellas células o tejidos que pueden ser utilizados para la reproducción humana asistida. Por tanto, habría que considerar también el tejido ovárico y el de testículo. Además, los centros de reproducción asistida podemos considerarnos a efectos de este RD como **establecimientos de tejidos**, ya que llevamos a cabo actividades de procesamiento, preservación, etc. desde su obtención y hasta su utilización o aplicación en humanos. También podemos ser los encargados de la obtención y evaluación de tejidos y células. El Capítulo I también contempla una serie de requisitos, la mayoría de los cuales están recopilados en la Ley 14/2006, pero que pueden complementar, si cabe, las acciones referidas a las donaciones de gametos en los centros de reproducción asistida:

El Artículo 3 fija el carácter voluntario, altruista y de procedimiento no gravoso para la donación, pudiendo recibir compensación limitada a cubrir gastos, dietas, etc.

En cuanto a la promoción y publicidad (Artículo 4) serán de forma general, señalando su carácter voluntario, altruista y desinteresado. Estará sometida a inspección y en el caso de que sea falsa o tendenciosa, que induzca a error, será incompatible con la autorización de actividad para el centro.

Por supuesto, se garantizará la confidencialidad de todos los datos relacionados con la salud de los donantes, así como de los resultados y trazabilidad de sus donaciones, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Se aplicará además el nivel alto de seguridad respecto al tratamiento de los datos relacionados con los donantes (RD 994/1999)

El **Capítulo II** regula la **donación y obtención de células y tejidos humanos**, haciendo referencia a los donantes vivos y fallecidos, a la selección y evaluación del donante, al procedimiento de obtención, empaquetado, etiquetado y transporte, así como al sistema de recogida y custodia de la información y nos refiere a varios Anexos de este RD. Respecto a las **autorizaciones de las actividades** de los centros y unidades, el Artículo 9 dice que se regularán según lo dispuesto en el RD 1277/2003, con una serie de requisitos mínimos que se detallan en el Anexo I. Además, los centros y unidades autorizados para la obtención de células y/o tejidos deberán facilitar los datos relativos a su actividad que les sean requeridos por las autoridades sanitarias competentes de su comunidad autónoma, que los remitirá a la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) según lo previsto en el Capítulo V de este RD. No obstante, creemos que esto no nos afecta ya que las autorizaciones que nos regulan están especificadas en el artículo 17 de la Ley 14/2006. Además, los registros de donantes y de actividad y resultados de los centros de reproducción asistida, así como el suministro de información quedan regulados mediante los artículos 21, 22 y 23, respectivamente, de la Ley 14/2006.

El **Capítulo III** regula el procesamiento, almacenamiento y distribución de las células y tejidos, con las autorizaciones a las que se hacen referencia en el Capítulo II. Podemos destacar los siguientes puntos:

Responsable técnico y personal adscrito. Cada centro deberá tener un

responsable con Titulación Universitaria Superior en el ámbito de la Medicina o las ciencias biomédicas y 3 años de experiencia mínima. Velará, facilitará y aplicará la normativa. Se notificará a la autoridad competente sus datos personales y cualquier sustitución que se realice de esta persona. El resto del personal deberá estar perfectamente cualificado. Por tanto, si realmente somos un establecimiento de tejidos, tendríamos que adecuarnos a esta normativa y realizar estos trámites. No obstante, cabe reseñar que, como centros de reproducción asistida, el Artículo 18 de la Ley 14/2006 regula las condiciones de funcionamiento de los mismos, designando al director del centro o servicio como responsable de las actuaciones de todo el equipo.

Importación y exportación. Autorizado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, previo informe de la ONT. Se efectuará a través de los recintos aduaneros especificados en el Anexo I del RD 65/2006, de 30 de Enero, por la que se establecen requisitos para la importación y exportación de muestras biológicas. Esta norma afectaría al envío y recepción de muestras (por ejemplo, seminales) con otros países. No obstante, en el contexto en que lo leemos entendemos que sería para llevar a cabo trasplantes entre diferentes países. Esta es, por tanto, una cuestión que habría que aclarar.

Relaciones entre los centros de tejidos y terceros. Establecimiento de contratos y registros, donde se especifiquen claramente las responsabilidades de los terceros en relación con los procesos que van a llevar a cabo, así como una descripción detallada de los mismos. Esto podría afectar a la distribución de muestras (principalmente seminales) a pacientes para uso particular o derivación a otros centros. Aunque este punto no esté recopilado en la Ley 14/2006, lo que los centros hemos estado llevando a cabo es que la persona que quiere llevarse una muestra propia, tiene que firmar una autorización o consentimiento haciéndose responsable de la misma. Por tanto, esto sería algo similar a lo que el RD pide.

Sistema de recogida y custodia de la información. Se designará una persona responsable de la recogida y custodia de la información. Hay que remitir información trimestral a organismos competentes. Creemos que este punto no nos afecta, ya que está regulado por la Ley 14/2006, en su Capítulo VII.

El **Capítulo IV** regula la aplicación de las células y tejidos, con los siguientes puntos:

Autorización según el RD 1277/2003 y el Anexo I.4. Según lo comentado en el Capítulo II, en nuestro caso estaríamos regulados por el Artículo 17 de la Ley 14/2006.

Acceso a las células y tejidos y condiciones generales de aplicación. Lo podemos interpretar como el acceso entre diferentes centros para llevar a cabo principalmente trasplantes y, por tanto, no lo tendríamos en cuenta.

Sistema de recogida y custodia de la información. Capítulo V del presente RD. Acceso restringido y confidencial. Remitir informes trimestrales. Lo mismo que en el Capítulo anterior, ya que este punto está regulado en la Ley 14/2006.

Investigación clínica. Según este RD, los centros tienen que tener la autorización y presentar una documentación a incluir en la solicitud del proyecto. La autoridad informará cada seis meses de los proyectos autorizados y en ejecución dentro de su Comunidad Autónoma. Este apartado tampoco nos afectaría ya que estamos regulados respecto a investigación con gametos y preembriones humanos en el Capítulo IV de la Ley 14/2006. Además, existe una Comisión, dependiente del Instituto Carlos III encargada de emitir informes relativos a los proyectos de investigación relacionados con la obtención, desarrollo y utilización de líneas celulares troncales embrionarias.

En el **Capítulo V** se regulan los sistemas de información, seguimiento y

biovigilancia:

Registro de centros. La ONT desarrollará un registro donde se detallarán cada centro y cada actividad. Será de acceso público y tendrá un responsable de mantenimiento y custodia. Este apartado lo tenemos regulado en los artículos 21 y 22 del Capítulo VII de la Ley 14/2006.

Sistema de información general. La ONT desarrollará un sistema de recogida y custodia de la información. Realizará un informe anual, que será accesible al público y se remitirá a los centros. En disposición transitoria primera establece el plazo de 6 meses para que la ONT desarrolle este sistema. También lo tenemos regulado en el Capítulo VII de la Ley 14/2006.

Trazabilidad. Anexo VI. Se codificará según los anexos VI y VII. Contemplará el rastreo de origen a destino de todas las células y tejidos (así como productos y materiales en contacto).

La información se guardará y custodiará de forma segura durante al menos 30 años a partir de su codificación. Creemos que estas codificaciones no son necesarias en nuestro caso, ya que los datos y registros que generamos están regulados y sometidos a auditorías externas tal y como refleja la Ley 14/2006.

Sistema de codificación. Anexo VII. Se establecerá un sistema único y obligatorio de codificación, compatible con los sistemas de otros estados miembros de la Unión Europea para identificar de forma única e inequívoca los tejidos y células. De la misma forma que en el apartado anterior, creemos que este sistema de codificación no tiene nada que ver con las actividades que realizamos en los centros de reproducción asistida, que como hemos comentado en el apartado anterior tiene sus propias normas y regulaciones.

Sistema de Biovigilancia. Anexo VIII.

Garantizará un procedimiento rápido de retirada de todo producto relacionado con efectos adversos graves. Podríamos considerar que este apartado tampoco nos afecta, ya que no generamos problemas de salud pública que requieran sistemas de biovigilancia. En la Ley 14/2006 tenemos una serie de normas de funcionamiento de los centros y equipos, así como de infracciones y sanciones y de seguimientos que regulan la buena praxis de los centros de reproducción asistida.

En el **Capítulo VI** se detallan los aspectos relativos a la Inspección, evaluación y acreditación e infracciones y sanciones.

Inspección y evaluación. Plan de inspecciones periódicas, intervalos y condiciones de realización. Inspecciones extraordinarias y peticiones. Como hemos comentado, la Ley 14/2006 recoge en su Artículo 19 la posibilidad de someter a los centros a auditorías externas en los centros de reproducción asistida.

Infracciones y sanciones. Artículo 37 de este RD. Reguladas en nuestra Ley 14/2006 en el Capítulo VIII.

Una vez vistos los Capítulos de los que consta el RD, pasaremos a comentar los Anexos que puedan ser de interés o que nos pueden afectar. En concreto, en el **Anexo IV**, sobre **selección y evaluación del donante de células reproductoras**, es donde podemos encontrar algún aspecto a incluir en nuestra práctica habitual, y que no contempla la Ley 14/2006. En concreto, los donantes de esperma deben tener determinaciones serológicas concretas, y además de los habituales, se incluyen marcadores negativos para Chlamidia en una muestra de orina y por determinación mediante PCR. Hemos marcado en negrita los aspectos que pueden ser de interés y que se escriben a continuación:

ANEXO I.- REQUISITOS Y CONDICIONES MÍNIMOS PARA AUTORIZACIONES.

1.- Requisitos mínimos

c) Cuando el destino de las células o tejidos extraídos sea su derivación a un establecimiento de tejidos para su procesamiento, deberá existir un acuerdo de colaboración que incluirá un protocolo consensuado con dicho establecimiento.

k) Mantener un archivo de sueros de los donantes. **En el caso de las células reproductoras, el archivo de sueros se mantendrá durante dos años a partir de la última transferencia.**

i) Disponer de un procedimiento operativo estandarizado para el envasado, etiquetado y transporte de las células y/o tejidos hasta el punto de destino.

2.- Requisitos técnicos

a) En cuanto a la organización y dirección:

1º. Además del Director del establecimiento se debe designar un responsable técnico.

b) En cuanto a equipo y material:

3º. Todo equipamiento nuevo o reparado debe ser evaluado en el momento de su instalación y debe ser validado antes de ser utilizado.

4º. Las actividades de mantenimiento, limpieza, desinfección, saneamiento y revisión del equipamiento crítico deben figurar en procedimientos documentados y se deben llevar a cabo de forma regular.

c) En cuanto a infraestructura y locales:

2º. Para el procesamiento de células o tejidos en condiciones de exposición abierta, se deberán especificar las condiciones de calidad de aire y limpieza que exigen para minimizar los riesgos de contaminación.

3°. Siempre que las células o tejidos se vayan a procesos en exposición abierta se exigirá una calidad de aire con de partículas y de colonias micro-biológicas equivalente a la especificada como grado A en el anexo I de la Guía Europea de Normas de Correcta Fabricación.

6°. Para el almacenamiento de las células o tejidos, se deberán especificar y definir las condiciones de almacenamiento.

8°. Deberá disponerse de una infraestructura de almacenamiento que permita separar y distinguir aquellos tejidos y células que están en cuarentena de aquellos que han sido rechazados, o de los que han sido aceptados.

3.- Requisitos para la autorización de procesamiento, almacenamiento y distribución

b) En cuanto al almacenamiento:

3°. Existirán medios de control ambiental de las áreas de acondicionamiento y almacenamiento.

5°. Deben poder identificarse claramente las células y tejidos almacenados en todas las fases del procesamiento en el establecimiento de tejidos y debe ser posible distinguir claramente entre aquellas células y tejidos que están en cuarentena y los que están listos para ser distribuidos o los que deben ser descartados.

c) En cuanto a su distribución y retirada:

1°. Se deben definir las condiciones y el tiempo máximo de transporte, que permitan mantener las propiedades biológicas y funcionales de las células y tejidos.

2°. El contenedor debe ser seguro y garantizar que las células y tejidos

se mantienen en las condiciones especificadas.

6°. Las acciones deben estar emprendidas en tiempos predefinidos.

d) En cuanto al etiquetado: Debido a la extensión de este apartado, y para no hacer demasiado extenso este artículo, recomendamos la lectura de este apartado en el RD.

ANEXO IV. SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL DONANTE DE CÉLULAS REPRODUCTORAS

2.- Donación entre miembros de la pareja para uso diferido

Cuando las células reproductoras vayan a ser almacenadas o procesadas, se deberán seguir los siguientes criterios:

2.1 El facultativo responsable del proceso de donación de gametos debe determinar y documentar, sobre la base de la historia clínica y la indicación terapéutica, la justificación para la obtención y los criterios de seguridad para la madre y los hijos que pudieran resultar del proceso.

2.2 Se realizarán los siguientes tests serológicos:

HIV 1 y 2: Anticuerpos Anti HIV-1, 2.

Hepatitis B: Antígeno HBs / Anticuerpos anti HBC.

Hepatitis C: Anticuerpos Anti VHC.

Cuando los resultados de los tests sean positivos o no estén disponibles, o cuando se sabe que el donante tiene algún factor de riesgo de transmisión de estas enfermedades, se deberá programar un sistema de almacenamiento aislado.

2.3 Los tests de determinación de anticuerpos anti HTLV I y II se realizarán en donantes que viven o vienen de áreas con una elevada incidencia de enfermedad o cuyas parejas sexuales o progenitores vengán o vivan

en áreas de elevada incidencia de enfermedad.

2.4 En algunas circunstancias se requerirán tests adicionales (malaria, toxoplasma, *Tripanosoma cruzi*, dengue, CMV, VEB, RhD).

2.5 El hecho de que los tests sean positivos no impide necesariamente que se puedan utilizar las células obtenidas en casos de donación entre personas de la misma pareja.

3.- Donaciones fuera de la pareja

b) Los donantes deben tener **marcadores serológicos negativos para HIV 1 y 2, HVC y HVB y sífilis**. Los donantes de espermia deben tener, además, marcadores negativos para *Chlamidia* en una muestra de orina y por determinación mediante PCR.

c) Se realizarán tests de determinación de anticuerpos anti HTLV I y II cuando se considere necesario.

d) En algunas circunstancias se requerirán tests adicionales (malaria, CMV, *Tripanosoma cruzi*, RhD).

f) Se llevará a cabo una evaluación de la **carga genética** en relación a la existencia de genes autosómicos recesivos cuando proceda.

g) Se llevará a cabo una **evaluación del riesgo de transmisión de enfermedades hereditarias conocidas y presentes en la familia**.

h) Se deberán realizar tests biológicos:

1°. Las muestras de sangre se obtendrán en el momento de la donación.

2°. Las muestras de espermia se mantendrán en cuarentena, al menos, 180 días, tras lo cual se repetirán los tests biológicos. Esta segunda evaluación se podrá evitar si la primera determinación se hizo mediante test de amplificación de

ácidos nucleicos.

ANEXO V. PROCEDIMIENTOS DE DONACIÓN, EXTRACCIÓN DE CÉLULAS Y TEJIDOS Y SU RECEPCIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO DE TEJIDOS.

1.4.- Documentación del donante

j) En el caso de donantes de esperma la información mínima a consignar será:

1º. Nombre del establecimiento de tejidos de destino.

2º. Datos de identificación del donante.

3º. Fecha y hora de la obtención.

1.7.- Etiquetado del contenedor externo de transporte. *Debe figurar una etiqueta donde se especifique la siguiente información:*

- a) «Muestra biológica de células/tejidos - Manejar con cuidado».*
- b) Identificación del establecimiento de tejidos de origen del tejido y/o grupo celular.*
- c) Identificación del establecimiento de tejidos de destino.*
- d) Fecha y hora de inicio del transporte.*
- e) Especificaciones para mantener las características biológicas de las células o tejidos durante el transporte.*
- f) Especificaciones de almacenamiento.*

2.- Recepción del tejido y/o grupo celular en el establecimiento de tejidos

2.1 Condiciones Generales. *Se llevará a cabo un procedimiento documentado de verificación de que el envío recibido cumple con todos los requisitos exigidos, tanto en este real decreto como en las especificaciones del propio establecimiento de tejidos.*

2.2- Registro de datos

2.2.2 En el caso de las donaciones de células reproductoras fuera de la pareja habitual, se consignarán además los siguientes datos relativos a los donantes: talla, peso, raza, color de piel, color de ojos, color de pelo, textura de pelo, grupo sanguíneo y Rh.

2.2.3. En el caso de células reproductoras que van a ser utilizadas en el seno de la pareja habitual, los datos que se consignarán son:

a) Consentimiento /autorización para la extracción.

b) Datos de identificación del donante.

c) Datos de identificación de la pareja.

d) Lugar de la obtención del grupo celular.

e) Células o tejidos obtenidos y sus características más relevantes.

ANEXO VI. INFORMACIÓN MÍNIMA EN EL SISTEMA DE TRAZABILIDAD

1.- Información que debe guardar y custodiar el establecimiento de tejidos:

- a) Identificación del centro, unidad u organismo de obtención autorizado.*
- b) Número identificativo único de donación.*
- c) Fecha de obtención.*
- d) Lugar de obtención.*
- e) Tipo de donación /obtención.*
- f) Identificación del establecimiento de tejidos.*
- g) Tipo de tejido o grupo celular.*
- h) Número de lote, si procede.*
- i) Número de subpartición, si procede.*
- j) Fecha de caducidad.*
- k) Estatus del tejido/grupo celular: Disponible/Descartado/ Cuarentena*
- l) Descripción del producto células o tejido.*

m) Etiquetado interno y externo del tejido o grupo celular.

n) Fecha de disponibilidad.

o) Identificación del centro o unidad de aplicación.

2.- Información a guardar y custodiar el centro o unidad de aplicación:

a) Identificación del establecimiento de tejido proveedor.

b) Identificación del responsable de la unidad o centro de aplicación.

c) Tipo de tejido/grupo celular.

d) Identificación del producto.

e) Identificación del receptor o persona en la que se aplica el tejido o grupo celular.

f) Fecha de utilización, aplicación o en su caso descarte y causa de no utilización en este último su puesto.

Como hemos comentado, este RD está enfocado hacia los trasplantes de células y tejidos. Hemos intentado aclarar un poco cuales son los aspectos que nos pueden afectar y que debemos incluir en nuestros protocolos actuales. No obstante, queremos insistir en plantear cualquier tipo de duda a los profesionales cualificados que disponemos hoy en día para ello.



El comienzo de la vida,
en manos seguras



MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS

MediCult IVM System representa un progreso importante en Reproducción Asistida. Se trata de una nueva técnica que elimina el riesgo de hiperestimulación ovárica (HSO) en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP), consiguiendo así una mayor simplicidad del proceso y un mayor control médico del ciclo.

MediCult España S.L.

Gran Via Corts Catalanes 184, 7 · 08038 Barcelona · Spain
Tel.: +34 93 394 53 91 · Fax: +34 93 394 53 80
www.medicult.com



MediCult
Innovation with Care

EFECTO DE LA ECLOSIÓN ASISTIDA EN RELACIÓN AL PORCENTAJE DE GESTACIÓN EN EMBRIONES CRIOPRESERVADOS

Effects of Assisted Hatching on the rates of gestation in cryopreservation embryos.

Mónica Dorado*, María Hebles**, Beatriz Migueles*, Mercedes González*; Pascual Sánchez**, Fernando Sánchez**

*Fundación Guadalquivir de Investigación Médica. **Clínica Ginemed, c/Farmacéutico Murillo Herrera, nº 3, 41010, Sevilla, España. ginemed@ginemed.com

RESUMEN: El objetivo del estudio es comprobar el efecto de la eclosión asistida con ácido Tyrode en embriones descongelados. Se estudiaron un total de 1224 parejas sometidas a ciclos de reproducción asistida.

Observamos y evaluamos la calidad de los embriones descongelados en relación al número de embriones que sobreviven y el porcentaje de blastómeras lisadas de dichos embriones. Comparamos el porcentaje de embarazos en ciclos de descongelados con y sin eclosión asistida. Aparecen diferencias significativas en el porcentaje de embarazos en el grupo de embriones que han sido sometidos a eclosión asistida ($P<0,05$), y también observamos una mejor tasa de embarazos en transferencias con embriones de calidad inferior (supervivencia inferior al 60%) cuando son sometidos a eclosión asistida.

Palabras clave: eclosión asistida, Tyrode, criopreservación de embriones

SUMMARY: The objective of this study is to evaluate the impact of embryos assisted hatching with Tyrode's acid in thawed embryos. It was studied a total of 1124 couples undergoing infertility treatment. We observed and evaluate the quality of thawed embryo in relation to the number of that survived, and the rate of blastomeres death. We compared the rate of pregnancies on thawed embryos cycles with and without assisted hatching. There were some significant differences between two group, we also detect a better rate pregnancy using assisted hatching when the survival is badly (surviving rate is less than 60%).

Key words: Assisted hatching, Tyrode, cryopreservation embryos

INTRODUCCIÓN

La baja tasa de implantación del embrión humano es uno de los factores limitantes para las técnicas de reproducción asistida (Bernabeu et al., 2004).

La estimulación ovárica en los tratamientos de fecundación in vitro (FIV) pretende conseguir un desarrollo folicular múltiple para la obtención de varios óvulos y consecuentemente un número mayor de embriones. Esto permite una mayor selección de embriones para transferir. Con este au-

mento en el número de embriones respecto a un ciclo natural, buscamos en parte solucionar el menor poder implantatorio de los embriones cultivados in vitro (Ernest Hung Yu Ng et al. 2005). Habitualmente se transfieren 2 ó 3 embriones, quedando embriones para congelar según criterios de calidad, como número de blastómeras, grado de fragmentación y ausencia de multinucleación. Los embriones criopreservados y posteriormente descongelados tienen una tasa de implanta-

ción y embarazo disminuida con respecto a los mismos en fresco (Turcker et al. 1991).

Una de las causas de la disminución de la implantación puede ser debida al endurecimiento de la zona pelúcida (ZP) (Gabrielsen et al 2004), producido durante el proceso de congelación - descongelación. Otra causa puede ser la presencia de blastómeros lisados e intactos en un embrión

tras la descongelación, este hecho puede afectar la viabilidad de los intactos y comprometer el desarrollo embrionario (Belil et al 2002).

Ernest Hung Yu Ng et al. 2005 han planteado la eficacia de la eclosión asistida sobre la implantación embrionaria, especialmente en embriones que han sufrido congelación-descongelación. Estudios in vitro con embriones humanos han mostrado que una abertura en la ZP mejora significativamente capacidad del blastocisto para eclosionar (De Vos et al. 2000).

Dos recientes meta-análisis (Edi-Osagie et al. 2003 y Sallam HN et al. 2003) refieren que el hatching asistido (AH) incrementa el porcentaje de implantación y embarazos, especialmente en mujeres mayores o con valores aumentados de FSH. Tao y Tamis 1997 mostraron un aumento significativo en el porcentaje de embarazos con hatching asistido mediante ácido de tyrode en pacientes con pobre pronóstico, en mujeres mayores de 38 años y embriones de mala calidad. Cohen et al. 1999 también documentaron un aumento significativo en ciclos de donación de óvulos.

El objetivo de este estudio es comparar el efecto del hatching asistido en la implantación y desarrollo de los embriones que han sido sometidos a procesos de congelación - descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes

Se realizó un estudio observacional retrospectivo que incluye 1224 ciclos de transferencia de embriones descongelados procedentes de ciclos de ICSI y que fueron congelados en día +1 y/o día +2 en un único centro. Todas las parejas con embriones congelados fueron informadas para poder participar en el estudio.

dio.

Realizamos un estudio comparativo de las tasas de embarazo e implantación embrionaria obtenidas en ciclos de embriones congelados y descongelados de pacientes que han sido sometidos a hatching frente a los que no se les ha realizado hatching.

Programación del ciclo inicial de FIV-ICSI

Los ciclos de ICSI seleccionados fueron realizados en protocolo corto tras un mes de reposo ovárico con anticonceptivos. Para supresión se utilizó análogos de la GnRH (aGnRH, Decapeptyl diario®) comenzando en el Día 2º del ciclo menstrual a dosis de 1/2 vial al día. Según los niveles séricos de FSH, LH y estradiol, y en función de la edad de la paciente, se fijan las dosis de estimulación ovárica con hormona folículo estimulante (FSH, Gonal-F®) y Menotropina (Menopur®).

La administración de estos se individualiza de acuerdo al control ecográfico del ciclo. El criterio para la administración de la hormona gonadotrófica humana (10.000 UI de hCG, Lepori®) es la presencia de la mayoría de la cohorte de folículos con 16 o más mm. de diámetro. La administración de aGnRH y FSH se suspende el día de la administración de la hCG.

Las punciones se realizaron a las 36 horas de la administración de la hCG por vía vaginal ecoguiada. La microinyección se llevó a cabo entre las 3 y 6 horas de la captación ovocitaria. La fecundación se evaluó a las 16-20 horas y la selección de embriones a transferir a las 42-44 horas (día 2) o las 66-68 horas (día 3) catalogando los embriones según el número de blastómeras, simetría de tamaño y la cantidad de fragmentos citoplásmicos.

Procedimiento de congelación de

embriones

Todos los embriones excedentes fueron crioconservados con Freezen kit 1™ (Vitrolife) en pajuelas de 0,5 mL (CryoBio System) en un congelador manual Nicool MS21 de Air Liquide. El congelador fue programado para bajar 2°C/min desde una temperatura de 25°C hasta -6,9°C. Tras esperar 8 min a esta temperatura se realiza el seeding de forma manual. A continuación el congelador está programado para bajar 0,3°C/min hasta llegar a -29,9°C cuando la pajuela es depositada en el nitrógeno líquido a -196°C y almacenadas en cantaras adecuadas hasta su utilización.

Preparación para las transferencias en ciclo de congelados

Tras comprobar por ecografías que el endometrio era delgado, el día 5º del ciclo se comienza con una sustitución de estrógenos en parches (ESTRADOT®) comenzando con parches de 50 y aumentando en función de la respuesta a nivel endometrial hasta obtener un endometrio que sea anecógeno, en triple línea y por encima de 7 mm de espesor entre ambas capas. Durante todo el tiempo de tratamiento con estrógenos se suplementa con AAS (AAS-100®) y se valora el flujo sanguíneo al útero. Los ciclos en los que hay un SOPQ la paciente se encuentra en tratamiento con Metformina (Diamben 850®) con una o dos pastillas al día en función de tolerancia y de forma continua. En el caso de que en el Doppler que se hace de rutina en la arteria uterina el flujo sea discontinuo se añade un tratamiento con Pentoxifilina (HEMOVAS 400®)

Cuando el endometrio está listo (mayor de 7 mm en triple línea y anecógeno), se prepara para la transferencia de los embriones: se administran por vía vaginal dos comprimidos de progesterona (Utrogestan 200mg®) cada 12 horas

con un total de 800 mg al día. Se comienzan a administrar 3 días antes de la transferencia. El tratamiento con estradiol y progesterona se mantiene igual hasta el día de la α -hCG (dos semanas) y si ésta es positiva se mantiene hasta la semana 12 de embarazo.

Todas las pacientes se suplementan con ácido fólico a partir de la transferencia de los embriones.

Procedimiento de descongelación

Se procede a la extracción de las pajuelas de congelación y se elimina el exceso de nitrógeno de la pajuela. Se deja unos 30 segundos a temperatura ambiente y se pasa al baño térmico a 30°C otros 30 segundos. Después, pasamos los embriones por cada uno de los medios secuenciales de Thaw-kit 1™ (Vitrolife) preparados en placas Nunc™ para eliminar el crioprotector.

Una vez terminado el proceso de descongelación se pasan los embriones a la placa de cultivo hasta el momento de la transferencia.

El protocolo de descongelación se lleva a cabo en función del día en que se congelaron los embriones: Si la congelación se hizo en pronúcleos la descongelación se realiza dos días antes de la transferencia y si fue realizada en día +2, el día de antes de la descongelación.

Una vez descongelados se verifica la calidad de los embriones y de acuerdo con el protocolo se realiza hatching asistido.

La transferencia se realiza aproximadamente una hora después de haber realizado el hatching. El número de embriones transferidos varía de 1 a 3 en función de la calidad. Todas las transferencias fueron realizadas con medio G2™ version 3 de Vitrolife y catéter de Gynetics®.

Procedimiento de AH

Los embriones que iban a ser transferidos fueron colocados en microgotas de 25 μ m de Oocyte Wash Buffer (Cook) de forma individual bajo aceite mineral de Cook®. Para llevar a cabo el procedimiento se utilizó una placa Falcon 1006 (Becton Dickinson, Dinamarca).

La pipeta Holding (20 μ m) y la de hatching (9-10 μ m) eran proporcionadas por Humagen. El control de salida del ácido de Tyrode (Medi-Cult) hacia la zona pelúcida era llevado a cabo con un microinyector (Narishige, Dinamarca).

Para la realización del hatching se realizó un orificio de 30 μ m de diámetro. Una vez efectuado, el embrión se llevó al otro lado de la gota para liberarlo del ácido. A continuación fue pasado a la placa de doble pocillo (Falcon 353037) en medio Blastocyst (Cook) para la posterior transferencia. Se utilizaron 2 microinyectores Narishige en una placa calefactora a 37°C en un microscopio de contraste de fase Nikon con óptica de Hoffman.

Análisis estadístico

La comparación estadística fue llevada a cabo mediante el test de Student, test de Chi-Cuadrado y test de ANOVA. Consideramos que existen diferencias significativas cuando se obtienen valores $P < 0,05$.

La edad media de las pacientes entre el grupo control (grupo al que no se realizó el AH) y el grupo estudio (grupo con AH) fue comparada utilizando el test de Student.

El embarazo clínico fue definido por la presencia de 1 o más sacos de gestación. Para analizar la tasa de embarazo entre ambos grupos se utilizó el test de ANOVA y el test

de Chi-cuadrado.

RESULTADOS

Los datos del presente trabajo fueron obtenidos en el periodo comprendido entre Abril del 2003 y Abril 2006. Durante este tiempo se realizaron un total de 1224 ciclos de descongelación, de los cuales a 590 ciclos se les practicó el hatching asistido (grupo estudio) y a 634 ciclos no les fue practicado (grupo control). Debido al proceso de descongelación 61 ciclos fueron excluidos por la no supervivencia de los embriones entre ambos grupos.

Nosotros comparamos 1726 embriones a los que se les realizó AH en 590 transferencias con el grupo control de 1862 embriones en 634 transferencias a los que no se les realizó. Los embriones no fueron dañados durante el procedimiento. La edad de las mujeres en el momento de la aspiración de los ovocitos fue similar (33,32 frente a 33,17 años). No existen diferencias en el número previo de ciclos, respuesta ovárica y número de ciclos de descongelados.

La media de embriones transferidos en el grupo estudio y grupo control fue de 2,92 y 2,93 respectivamente.

Consideramos embarazo cuando se observa en la ecografía latido fetal. Como muestra la [tabla I](#) existen diferencias significativas entre ambos grupos en el porcentaje de embarazo global 116 (19,66 %) frente a 101 (15,93 %). La [tabla II](#) compara el porcentaje de embarazos en relación a la tasa de supervivencia de la cohorte de embriones descongelados.

En esta tabla también observamos un mayor porcentaje de embarazos cuando realizamos hatching en embriones que tienen una tasa de supervivencia menor del 60%, en concreto 20

Tabla I: Comparación de ciclos con y sin *hatching*

	sin <i>hatching</i>	con <i>hatching</i>	valor <i>P</i>	
Nº de ciclos	634	590		
Edad pacientes	33,17±3	33,32±3,1	<i>P</i> =0,794	t-test
Nº embriones transferidos	1862	1726	<i>P</i> =0,138	t-test
Embarazos en función del nº embriones transferidos				
0	(5/120) 5%	(10/156) 6,41%	<i>P</i> =0,416	ANOVA
1	(14/104) 13,46%	(28/136) 20,59%	<i>P</i> =0,151	ANOVA
2	(18/154) 11,69%	(44/160) 27,5%	<i>P</i> =0,001*	ANOVA
3	(64/252) 25,39%	(68/268) 25,37%	<i>P</i> =0,86	ANOVA
% embarazos total	(101/634) 15,93%	(116/590) 19,66%	<i>P</i> =0,001*	chi-cuadrado con corrección de Yates

Tabla II: Comparación de los ciclos con y sin *hatching* en función de la tasa de supervivencia a la descongelación de cada cohorte.

Tasa de supervivencia	sin <i>hatching</i>	con <i>hatching</i>	valor <i>P</i>	
<60%	(8 de 126) 6,35%	(20 de 130) 15,38%	<i>P</i> =0,021*	ANOVA
≥ 60%	(93 de 508) 18,30%	(94 de 460) 20,43 %	<i>P</i> =0,315	ANOVA

(15,38%) frente a 8 (6,35%).

DISCUSION

La transferencia de embriones que han sufrido un proceso de congelación-descongelación arroja una tasa de embarazo menor que con la transferencia de embriones en fresco, incluso tratándose de embriones de igual calidad (Gabrielsen et al., 2004).

Como se ha comentado anteriormente, esto puede ser debido, entre otras causas a una degeneración de blastómeras y a un endurecimiento de la zona pelúcida.

Turcker et al. (1991) explicaron que la reducción de implantación en ciclos de FIV-ET puede ser debido al endurecimiento de la zona pelúcida. Para embriones tanto frescos como descongelados el cultivo in vitro puede llevar a un endurecimiento de la zona pelúcida (Cohen et al., 1990).

En nuestro estudio hemos observado que con la transferencia de 2 embriones de calidad a los que se les practicó el hatching obtenemos tasas de embarazo equiparables a la transferencia de 3 embriones de calidad; por tanto, podríamos disminuir el número de embriones a transferir, bajando así la probabilidad de embarazo múltiple.

La tasa global de embarazo entre ambos grupos muestra diferencias significativas cuando realizamos el AH. Observamos que hay una tendencia a una tasa de embarazo mayor tras la transferencia de embriones a los que se les practicó el AH cuando no todos los embriones son de buena calidad, con lo cual estaría justificada su realización.

Gabrielsen et al. (2004) obtienen unos resultados que apoyan nuestro estudio. A pesar de ello, Al-Nuaim y Jenkins (2002) concluyeron que es inapropiada la realización por rutina por no existir evidencias del beneficio en embriones de buena calidad.

Cuando la tasa de supervivencia de los embriones descongelados es baja (<60%)

es aconsejables la realización del AH, pues observamos una diferencia significativa entre ambos grupos, favorables al grupo al que se le practicó el AH.

En conclusión, el AH con ácido de Tyrode mejora considerablemente en embriones descongelados en transferencias en las que no todos los embriones son de buena calidad. Hemos paliado la mala calidad embrionaria con la aplicación del AH consiguiendo las mismas tasas de embarazo que embriones de buena calidad.

En descongelaciones en las que la tasa de supervivencia es menor del 60% también es recomendada su aplicación ya que mejora significativamente la tasa de embarazo.

Cuando la transferencia se lleva a cabo con embriones de buena calidad no se observa un incremento en la tasa de embarazo, por lo tanto no está justificada su realización por rutina. La realización del AH selectivo mejora la tasa de gestación respecto a realizarla a todos los embriones.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Nuaim LA, Jenkins JM. Assisted hatching in assisted reproduction. *Br J Obstet. Gynaecol.* 2002; 109:856-62.

Belil I, Vanrell I, Castelló C, et al. ¿Puede la eclosión asistida incrementar el rendimiento del ciclo de criotransferencia? Comunicación oral XXIV Congreso Nacional SEF 2002; 257.

Bernabeu R, Brotons A, Mendiola J, et al. Estado actual del conocimiento de la implantación embrionaria humana. *RIF* 2004; 21:167-73.

Cohen J, Elsner C, Kort H, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Human Reprod* 1990; 5:7-13.

Cohen MA, Lindheim SR, Sauer MV. Assisted hatching causes beneficial affects on the outcome of subsequent fro-

zen embryo transfers of donor oocyte. *Ferti. Steril* 1999; 72:(Suppl 1), S5.

De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs* 2000; 166:220-227.

Edi-Osagie E, Hooper L, Seif MW. The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review. *Human Reprod* 2003; 18:1828-35.

Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, et al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 2004; 19:2258-62.

Ng EHY, Naveed F, Lau EYL, Yeung WSB, et al. A randomized double-blind controlled study of the efficacy of laser-assisted hatching on implantation and pregnancy rates of frozen-thawed embryo transfer at the cleavage stage. *Hum Reprod* 2005; 20:979-85.

Sallam HN, Sadek SS, Agameya AF. Assisted hatching- a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:332-42.

Tao J, Tamis R. Application of assisted hatching for 2-day-old frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:128-30.

Turcker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer, Wiker S, Wright G. Partial zona dissection of zona pellucida of frozen thawed human embryo may enhance blastocyt hatching, implantation, and pregnancy rate. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:341-45.

Biopsia Embrionaria “Aspectos Técnicos”

Embryo Biopsy “Technical Aspects”

Juan Manuel Moreno

Unidad de Reproducción Hospital Clínica Vistahermosa de Alicante. e-mail:lab@urvistahermosa.com

RESUMEN

La Biopsia embrionaria es una técnica que se utiliza en los laboratorios de reproducción asistida con el ánimo de mejorar la eficacia de los procesos de fecundación in vitro. Actualmente, entre las razones que hacen difícil apreciar el beneficio verdadero de esta técnica es su heterogeneidad metodológica, por lo que se pretende describir y valorar su utilidad a la luz de los conocimientos existentes.

Palabras clave: Biopsia embrionaria, transferencia embrionaria, ácido Tyrode, DGP.

ABSTRACT

The Embryo Biopsy is a technique that is used in the Assisted Reproduction Laboratories with the spirit to improve the efficacy of the In vitro fertilization cycles. At the moment, between the reasons that make difficult to appreciate the true benefit of this technique is its methodological heterogeneity, reason why it is tried to describe and to value his utility to the light of the existing knowledge.

Key words: Embryo biopsy, embryo transfer, Tyrode's acid, PGD.

INTRODUCCIÓN

La biopsia embrionaria es una técnica que consiste en extraer una o dos células de un embrión en división para analizarlas genéticamente (diagnóstico genético preimplantacional, DGP) y así poder seleccionar aquellos embriones libres de una determinada alteración genética antes de ser transferidos al útero. El resultado posibilita la identificación de anomalías en estadios previos a la implantación, evitando el desarrollo de anomalías genéticas y previniendo el aborto espontáneo provocado por estas.

La combinación de estos dos procesos, biopsia y posterior estudio genético, surgió en 1990 como alternativa al diagnóstico prenatal en parejas con un elevado riesgo genético (Handyside et al., 1990). Actualmente, es una técnica amplia-

mente utilizada no sólo en parejas portadoras de enfermedades genéticas hereditarias, anomalías cromosómicas o enfermedades monogénicas (Renwick and Ogilvie, 2007) sino también para aumentar las tasas de implantación en parejas de fecundación in vitro de mal pronóstico (Kuliev and Verlinsky, 2005) tales como pacientes de edad materna avanzada (Rubio et al., 2005), con fallos de implantación (Caglar et al., 2005), abortos previos (Munné et al., 2006) o factor masculino (Donoso et al., 2006). Incluso, se han incorporado otras indicaciones como la detección de determinados tipos de cáncer (Davis et al., 2006), enfermedades degenerativas y tipaje de HLA para trasplante de células madre procedentes de sangre de cordón umbilical en niños afectados de patologías hematológicas,

genéticas o adquiridas (Verlinsky et al., 2007), aunque algunas de estas indicaciones no están exentas de polémica tanto desde el punto de vista de su utilidad como desde la ética (Coulam et al., 2007; Kuliev and Verlinsky, 2005; Munné et al., 2006; Patricio et al., 2007; Twisk et al., 2006).

VALORACIÓN DE LOS MÉTODOS DE REALIZACIÓN DE BIOPSIA

Según la literatura existente, es aconsejable realizar la microinyección intracitoplasmática (ICSI) para generar los embriones que se vayan a biopsiar, ya que la ausencia de espermatozoides y células de la granulosa adheridas a la zona pelúcida, presentes durante una fecundación in vitro convencional (FIV), evitarían riesgos de con-

taminación durante el análisis genético posterior (Lissens and Sermon, 1997; Sermon et al., 1998).

Hay estudios que demuestran que la biopsia embrionaria en la etapa de 8 células.



no es perjudicial para el desarrollo posterior del blastocisto debido a que el índice mitótico es más alto, compensando así con mayor rapidez la célula perdida y además, la ausencia de compactación en los embriones permite que dicho estadio celular sea el idóneo para realizar el proceso (Hardy et al., 1990; Cieslak-Janzen et al., 2006).

Al parecer, si se extrae una célula en el estadio de cuatro células, durante el desarrollo del blastocisto se reduce la relación de la masa celular interna con el trofoectodermo (Tarín et al., 1992). No obstante, los embriones en el estadio de 6 u 8 células presentan un cierto grado de compactación debido a la formación de uniones celulares calcio-dependientes. Esto se puede solucionar utilizando un medio que bloquee las uniones entre las células (Dumoulin et al., 1998) y permita realizar la extracción de forma correcta. Sin embargo, para algunos autores esto puede provocar la despolarización de las células interfiriendo en el desarrollo posterior del embrión (Antczak and Van Blerkom, 1999; Edwards and Beard, 1997; Tarín and Handyside, 1993). Otra posibilidad es realizar la biopsia en la etapa de blastocisto, en los días 5 y 6 de desarrollo. Se obtendría un mayor número de células que permitiría una mayor fiabilidad en el diagnóstico aunque se disponga de menos tiempo para realizar

el análisis genético. De hecho en un estudio (Evsikov and Verlinsky, 1998) donde se biopsiaron células procedentes de la masa celular interna del blastocisto se observó un porcentaje elevado de blastocistos con mosaicismo. Mas recientemente, Coulam (Coulam et al., 2007) ha demostrado la presencia de un 75% de embriones con una situación de mosaico, discordantes cuando se hace biopsia de dos células y estudio cromosómico de las mismas mediante FISH en día tres; aunque un tercio de estos embriones anómalos se autocorrigen (Munné et al., 2005) no se puede excluir, en estos casos, la posibilidad de una disomía uniparental. Además, hay un estudio experimental para la beta-talasemia (Kokkali et al., 2007) que sugiere que la biopsia del trofoectodermo puede ser más ventajosa que la biopsia del embrión en división con respecto al resultado del diagnóstico al obtener una tasa de implantación del 47,6% frente al 26,7% procedente de la biopsia y análisis efectuado en día 3.

Para poder extraer la célula del embrión es necesario realizar previamente la eclosión asistida que consiste en crear, de manera artificial, un orificio en la zona pelúcida del embrión. En la literatura hay descritos varios métodos (mecánicos, químicos, con láser) y cada laboratorio usa uno u otro dependiendo de la experiencia del embriólogo que lo realiza y la disponibilidad técnica. En cualquier caso, el proceso requiere mucho cuidado en su ejecución para que no se produzca la lisis de alguna de las células del embrión y reste posibilidades de éxito. Además, se ha valorado si la eclosión asistida provocaba algún efecto perjudicial en los embriones y se demostró que la técnica no afecta en la tasa de anomalías cromosómicas en los nacidos vivos (Ma et al., 2006).

Un estudio prospectivo randomizado (Makrakis et al., 2006) que comparaba los métodos mecánicos y el láser dio como resultado una tasa de implantación significativamente más alta en el grupo del láser, además de una tasa de embarazo a término mayor aunque no significativa. Puede que el método mecánico, aunque fácil de

ejecutar, no de muy buenos resultados debido a que el pequeño orificio que se crea por la aguja de disección, produzca la posterior estrangulación del blastocisto cuando intenta eclosionar (Cohen et al., 1990). Otro método mecánico, con resultados prometedores es el piezo-micromanipulador que consiste en un sistema de vibración de alta frecuencia que rompe la zona pelúcida. Sin embargo su inconveniente principal es que al igual que el láser es un método costoso (Nakayama et al., 1999).

En otro estudio también prospectivo randomizado (Jones et al., 2006) donde se evaluó el método químico con ácido de Tyrode y el láser en el desarrollo del blastocisto, ambos métodos dieron un resultado similar al no encontrar diferencias significativas en la proporción de blastocistos obtenidos. El método químico, aunque requiere entrenamiento previo, tiene la ventaja de estar al alcance de cualquier laboratorio (Moreno and López, 2006a) pero debemos tener cuidado con el ácido pues corremos el riesgo de que un volumen excesivo dañe alguna célula de los embriones. Por otro lado, el láser endurece el área de la zona pelúcida expuesta (Malter et al., 2001), pudiendo dificultar la posterior aspiración de la blastómera. Sin embargo, las ventajas de utilizar el láser frente al ácido de Tyrode son la velocidad y precisión en su ejecución, no es tóxico y puede que se constituya como método de elección al reducir la experiencia técnica necesaria para llevarla a cabo (Joris et al., 2003). En otras palabras, puede estandarizar una técnica que actualmente no está normalizada.

Varios estudios relacionan el tamaño del orificio en la zona pelúcida con el incremento de la frecuencia de gemelos monocigóticos (Hershlag et al., 1999; Schieve et al., 2000) por lo que se aconseja no realizar aberturas muy pequeñas que puedan causar la herniación del blastocisto.

Tampoco son recomendables las aberturas muy grandes ya que se corre el riesgo de la salida de algún blastómero que comprometa la capacidad de desarrollo del embrión. La abertura del orificio debe ser aproximadamente _ partes el diámetro del blastómero a

biopsiar.

Una vez realizado el orificio, la célula puede extraerse mediante aspiración del blastómero o desplazamiento del mismo, sea con líquido o ejerciendo presión con la micropipeta contra la zona pelúcida. Nosotros, al igual que la mayoría de los centros, biopsiamos utilizando la aspiración con líquido (Moreno and López, 2006b) pues se controla mejor el proceso sin llegar a dañar la célula extraída ni al embrión biopsiado (Cieslak-Janzen et al., 2006).

Para realizar el proceso de biopsia es necesario usar un medio suplementado con un 10% de HSA para evitar que el embrión y el blastómero extraído se fijen a la placa. Además, debe llevar como solución amortiguadora HEPES que impida cambios de pH durante la realización de la técnica, e incluso carecer de Ca y Mg para bloquear las uniones entre los blastómeros del embrión y así favorecer la extracción. No obstante, es recomendable que el embrión no esté más de 10 minutos en estos medios ya que pueden comprometer el desarrollo in vitro posterior.

La biopsia embrionaria se puede efectuar con ayuda de un microinyector pero nosotros utilizamos un sistema bucal

de fabricación propia que nos permite realizar el proceso de una forma rápida, económica y controlada (Moreno and López, 2006b). Mediante acción controlada con la boca, se aspira en el interior de la micropipeta la cantidad



suficiente de medio que evite la pre-Sistema bucal de fabricación para biopsia embrionaria

sión negativa al aspirar posteriormente el blastómero. A continuación, se acerca la micropipeta a la abertura de la zona pelúcida, se expulsa ligeramente medio para expandir la abertura que bloquearemos con ayuda de la micropipeta. Posteriormente, se aspira el blastómero de forma suave, realizando un movimiento de arriba para abajo, de tal manera que éste pueda adaptarse a la luz de la micropipeta y no se rompa. Para ello, se debe presionar el blastómero al tiempo que lo aspiramos poco a poco

A veces, es necesario separar la micropipeta intentando arrastrar el blastómero hacia el exterior del embrión pero en este caso hay que evitar la aspiración porque se corre el riesgo



Durante la biopsia se debe presionar el blastómero al tiempo que lo aspiramos poco a poco.

Por último, se devuelve el embrión biopsiado a la placa de cultivo hasta obtener el diagnóstico.

El número de células a extraer de cada embrión va a depender de la calidad del embrión a biopsiar y del aná-



lisis genético que se vaya a realizar, no Blastómero una vez biopsiado

observando diferencias significativas en la tasa de implantación posterior (Van de Velde et al., 2000; Parriego et al., 2003), aunque hay autores que recomiendan extraer dos células para evitar un posible error de diagnóstico (Coulam et al., 2007). Sin embargo, en este estadio se activa el genoma embrionario (Tarín and Handyside, 1993; Fraude et al., 1988; Mottla et al., 1995) y la aspiración de dos células afectaría a dicha diferenciación pudiendo dar lugar a blastocistos con una menor proporción en el número de células de la masa celular interna y del trofoectodermo, comprometiendo así su capacidad de implantación.

Los resultados de un ciclo de DGP también van a estar influenciados por el número de embriones que se puedan analizar en cada caso. Por ello, hay grupos que aconsejan cancelar aquellos ciclos en los que se espera obtener menos de 6 ovocitos, ya que las expectativas de transferencia y embarazo se reducen considerablemente pues no todos los ovocitos se fecundan, ni todos los embriones son aptos para realizar el proceso (Vandervorst et al., 1998; Platteau, 2006). Incluso, durante el proceso algún embrión puede dañarse accidentalmente, comprometiendo así su desarrollo.

COMENTARIOS FINALES

La incorporación de la biopsia embrionaria a los Laboratorios de Fecundación in vitro y posterior estudio genético parece mejorar en el resultado general de los programas de reproducción asistida pues favorece un embarazo sano evolutivo con un menor gasto psicológico, fisiológico, e incluso económico. Es una técnica ampliamente utilizada no sólo en parejas con cariotipo alterado (Renwick and Ogilvie, 2007) sino también para aumentar las tasas de implantación en parejas de fecundación in vitro de mal pronóstico (Kuliev and Verlinsky, 2005; Rubio et al., 2005; Caglar et al., 2005; Munné et al., 2006; Donoso et al., 2006). Incluso, se han incorporado otras indicaciones como la detec-

ción de determinados tipos de cáncer (Davis et al., 2006), enfermedades degenerativas y tipaje de HLA para trasplante de células madre procedentes de sangre de cordón umbilical en niños afectados de patologías hematológicas, genéticas o adquiridas (Verlinsky et al., 2007).

Sin embargo, a la luz de los últimos estudios, el beneficio real del DGP es materia de controversia. En un meta-análisis realizado por Twisk y colaboradores (Twisk et al., 2006) se ha concluido que en los casos de edad materna avanzada, fallos repetidos de FIV, abortos de repetición y factor masculino su eficacia sigue siendo confusa. De hecho, los datos disponibles para la edad materna avanzada no demostraron ninguna diferencia en las tasas de embarazo evolutivo y nacido vivo. Por tanto, concluyen que hasta que no se demuestre un beneficio significativo debemos evitar su uso rutinario.

CONCLUSIÓN

La biopsia embrionaria y posterior estudio genético son claramente útiles para la selección de embriones con sin enfermedades monogénicas y en el tipaje de HLA para obtener embriones compatibles con hermanos que tengan algunas enfermedades hematológicas susceptibles de recibir trasplantes.

Sin embargo, en parejas de fecundación in vitro de mal pronóstico debemos ser cautos y hacer una correcta selección de los casos que se van a beneficiar del estudio genético. Además, el avance de la técnica debe ir unido al desarrollo de los aspectos profesionales, éticos, legales y sociales que aseguren una accesibilidad, seguridad y equidad en los procedimientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999; 14:429-47.
- Braude PR, Bolton V, Moor S. Human gene expression first occurs between four-and eight- cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332:459-62.
- Caglar GS, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Dietrich K, Al-Hasani S. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:381-88.
- Cieslak-Janzen J, Tur-Kaspa I, Ilkevitch Y, Bernal A, Morris R, Verlinsky Y. Multiple micromanipulations for preimplantation genetic diagnosis do not affect embryo development to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2006; 85:1826-29.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990; 5:7-13.
- Coulam CB, Jeyendran RS, Fiddler M, Pergament E. D Discordance among blastomeres renders preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy ineffective. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:37-41.
- Davis T, Song B, Cram DS. Preimplantation genetic diagnosis of familial adenomatous polyposis. *Reprod Biomed Online* 2006; 13:707-11.
- Donoso P, Platteau P, Papanikolaou EG, Staessen C, Van Steirteghem A, Devroey P. Does PGD for aneuploidy screening change the selection of embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men? *Hum Reprod* 2006; 21:2390-5.
- Dumoulin JCM, Bras M, Coonen E, Dreesen J, Geraedts JPM, Evers JLH. Effect of Ca²⁺/Mg free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Hum Reprod* 1998; 13:2880-3.
- Edwards R, Beard H. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:863-905.
- Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13:3151-5.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Ardí K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344:768-70.
- Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5:708-4.
- Hershlag A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril* 1999; 71:144-6.
- Jones AE, Wright G, Kort HI, Straub RJ, Nagy ZP. Comparison of laser-assisted hatching and acidified Tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2006; 85:487-91.
- Joris H, de Bos A, Janssens R, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of the results of human embryos biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode médium or a laser. *Hum Reprod* 2003; 18:1986-92.
- Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod* 2007; 22:1443-9.
- Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation diagnosis: a realistic option for assisted reproduction and genetic practice. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; 17:179-83.
- Lissens W, Sermon K. Preimplantation

genetic diagnosis: current status and new developments. *Hum Reprod* 1997; 12:1756-61.

Ma S, Rowe T, Yuen BH. Impact of assisted hatching on the outcome of intracytoplasmic sperm injection: a prospective, randomized clinical trial and pregnancy follow-up. *Fertil Steril* 2006; 85:895-900.

Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril* 2006; 86:1596-1600.

Malter H, Schimmel T, Calderón G, Cohen J. Use of Lasers in assisted Reproduction. *Annual Review of Preimplantation Embryology* 2001:147-156.

Moreno JM, López JJ. Enciclopedia audiovisual de técnicas de reproducción asistida: Eclosión asistida. *Animatic* 2006, vol 1.

Moreno JM, López JJ. Enciclopedia audiovisual de técnicas de reproducción asistida: Biopsia embrionaria y fijación para FISH. *Animatic* 2006, vol 2.

Mottla GI, Adelman MR, Hall JJ, Gindoff PR, Stillman RJ, Johnson KE. Lineage tracing demonstrates that blastomeres of early cleavage-stage human pre-embryos contribute to both trophoctoderm and inner cell mass. *Hum Reprod* 1995; 10:384-91.

Munné S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, et al. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril* 2005; 84:1328-34.

Munné S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006; 85:326-32.

Nakayama T, Fujiwara H, Yamada S, Tastumi K, Honda T, Fujii S. Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micro-

manipulator for morphologically low-quality embryos in poor-prognosis infertile patients. *Fertil Steril* 1999; 71:1014-18.

Parriego M, Solé M, Vidal F, et al. One- or two-cell biopsy; does it affect implantation potencial in PGD? *TWIN-Meeting Alpha-Andrology*; 2003, P-31.

Patrizio P, Bianchi V, Lalioti MD, Gerasimova T, Sakkas D. High rate of biological loss in assisted reproduction: it is in the seed, not in the soil. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:92-5.

Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening? *Reprod Biomed Online* 2006; 12:334-9.

Renwick P, Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert rev Mol Diagn* 2007; 7:33-43.

Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:497-506.

Schieve LA, Meikle SF, Peterson HB, Jeng G, Burnett NM, Wilcox LS. Does assisted hatching pose a risk for monozygotic twinning in pregnancies conceived through in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2000; 74:288-94.

Sermon K, Goossens V, Seneca S, Lissens W, De Vos A, Vandervorst M, et al. Preimplantation diagnosis of Huntington's disease (HD): clinical application and analysis of the HD expansion in affected embryos. *Prenat Diagn* 1998; 18:1427-36.

Tarín JJ, Conaghan J, Winston RML, Handyside AH. Human embryo biopsy on the second day after insemination for preimplantation diagnosis: removal of a quarter of the embryo re-

tards cleavage. *Fertil Steril* 1992; 58:970-6.

Tarín JJ, Handyside AH. Embryos biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril* 1993; 59:943-52.

Twisk M, Mastenbroek S, van Wely M, Heineman MJ, Van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection (Review). *The Cochrane Library* 2006; 1:1-16.

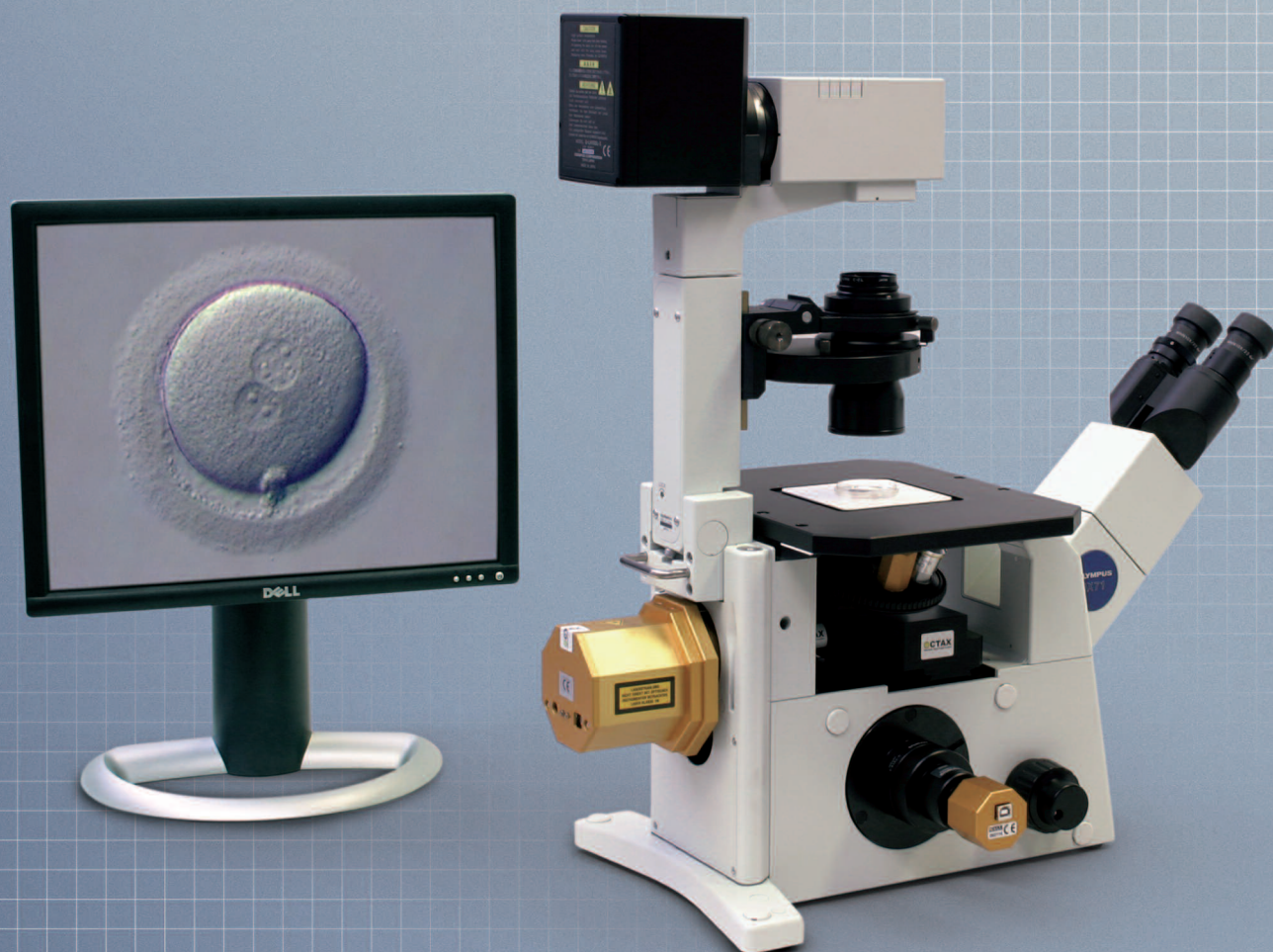
Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E, et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20:1030-7.

Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Hum Reprod* 1998; 13:3169-76.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Sharapova T, Laziuk K, Barsky I, Verlinsky O, et al. Preimplantation diagnosis for immunodeficiencies. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:214-23.

SISTEMA OCTAX™

Rapidez, precisión y
seguridad en su laboratorio



OCTAX EyeWare™

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

OCTAX EyeWare™ MX

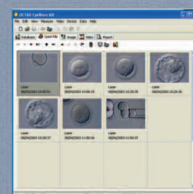
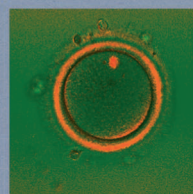
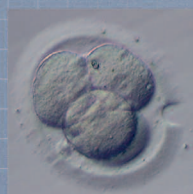
Grabación de vídeos.

OCTAX Laser Shot™

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

OCTAX ICSI Guard™

Visualización de la placa metafásica en tiempo real.



OLYMPUS

Your Vision, Our Future

INTRODUCCIÓN A AULA JOVEN

En este número de la revista ASEBIR abrimos nuevamente la sección AULA JOVEN que da cabida a los trabajos, en formato breve, de los/las alumnos/alumnas que realicen prácticas en los centros de RA. Desde la vocalía de publicaciones animamos a todos los equipos de biología y de embriología a que “empujen” a sus miembros más jóvenes a realizar sus primeros pasos en la ardua tarea de publicar resultados y a éstos los animamos a compartir con todos nosotros sus primeros resultados. Esperamos que esta sección sea una herramienta útil en su aprendizaje.

ESTUDIO DEL EFECTO DE PROLONGAR 1 HORA EL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN LA TÉCNICA DE SWIM-UP

Núria Alcañiz², Ivan Solvas¹, Mark Grossmann¹, Francesca Vidal¹, MCarme Pons¹

¹Unitat de Reproducció Assistida. Centro Médico Teknon (Barcelona) ura@cmteknon.com. ²Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto del tiempo de incubación prolongado sobre la recuperación de espermatozoides móviles en la técnica de swim-up.

Ubicación: Laboratorio de la Unitat de Reproducció Assistida de Centro Médico Teknon (Barcelona). Estudio incluido en la asignatura “Prácticas en empresa” de la titulación de Biología de la Universitat Autònoma de Barcelona (NA).

Material: 44 muestras de semen con un volumen $\geq 1,5$ ml y una concentración y movilidad de espermatozoides que permitiese su preparación mediante la técnica de swim-up.

Diseño: Preparar en paralelo dos fracciones de semen según el protocolo de swim-up descrito por la OMS y comparar la recuperación espermática (REM).

- Grupo 1 (incubación estándar de 1h): 0,75 ml de semen se reparten en 3 tubos y se cubren con 0,5 ml de medio de cultivo por tubo. Incubación durante 60 min a 37°C y 6%CO₂, en posición inclinada de 45°.

-Grupo 2 (incubación prolongado de 2h): Misma preparación pero con un período de incubación de 2h en las mismas condiciones.

Medidas principales: Se valora volumen, recuento espermático, movilidad y morfología en cada muestra de semen y REM después del período de incubación.

Conclusión: No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el REM de los dos grupos, por lo que no se considera útil aumentar el tiempo de cultivo en ninguna muestra.

Palabras clave: swim-up, tiempo de incubación y REM

ABSTRACT

Objective: To assess the effect of incubation time (1h versus 2h) during swim-up technique on motile spermatozoa recovery.

Centre: Laboratory of Unitat de Reproducció Assistida (Centro Médico Teknon, Barcelona). This study is included in the Biology degree at Universitat Autònoma de Barcelona of one of us (NA).

Material: 44 semen samples with volume $\geq 1,5$ ml and appropriate spermatozoa concentration and motility to perform the swim-up technique.

Experimentl design: Two aliquots from the semen sample were processed in parallel as follows:

-Method 1 (1h standard incubation period): 0,75 ml from the original semen sample were gently added to fresh medium at the bottom of 3 plastic tubes then placed in 45° angle for incubation during 60 min (37°C and 6%CO₂).

-Method 2 (2h incubation period): 3 plastic tubes filled in similar way were incubated during 2h under the same in vitro conditions.

Main measurements: Volume, sperm count, motility and morphology in semen samples and REM in the recovered fractions.

Conclusión: There are no statistically significant differences between the 2 groups. So it is useless to extend the period of incubation in any semen sample.

Key words: swim-up, period of incubation, sperm count and motility after incubation

INTRODUCCIÓN

La técnica de preparación del semen para Reproducción Asistida más utilizada en el laboratorio de reproducción asistida y la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1999) es el Swim-up o técnica de migración ascendente.

Este protocolo se recomienda por su sencillez y rapidez ya que la selección de los espermatozoides se realiza de forma pasiva aprovechando su capacidad natatoria para migrar hacia el medio de cultivo.

Dicha capacidad natatoria depende de varios factores como el porcentaje de espermatozoides móviles y el tipo de movilidad de éstos, así como de la composición del medio de cultivo y del tiempo de incubación (Andolz and Bielsa, 1995).

La técnica de swim-up evita la excesiva manipulación de la muestra reduciendo el riesgo de contaminación externa (Inaudi et al., 2002) así como también reduce la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) responsables de provocar daños en la membrana celular de los espermatozoides (Aitken and Clarkson, 1988) y disminuir la función espermática.

Según Andolz y Bielsa los espermatozoides seleccionados mediante la técnica de swim-up presentarían una mayor estabilidad nuclear así como una elevada tasa de penetración en ovocitos de hámster (Andolz and Bielsa, 1995), aunque Sakkas et al. (2000) publicaron conclusiones opuestas ya que obtienen mayores porcentajes de espermatozoides con integridad de DNA usando, como método de capacitación, gradientes de densidad.

A pesar de que el swim-up es una técnica que presenta múltiples ventajas, generalmente no se considera la técnica de elección en la preparación de muestras de semen de baja calidad ya que su rendimiento es inferior al obtenido por la técnica de separación por gradientes de densidad.

Por lo tanto, en un intento por aprovechar las ventajas que ofrece la técnica de swim-up, nuestro objetivo fue valorar la utilidad de prolongar el tiempo de incubación sobre el rendimiento final, especialmente en muestras de semen de baja calidad.

Por ello planteamos comparar los resultados de incubar una alícuota de cada una de las muestras de semen durante una hora (protocolo OMS; WHO, 1999), con los resultados de incubar una segunda alícuota de la misma muestra en las mismas condiciones de cultivo aunque durante un período más largo, en concreto de dos horas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de semen estudiadas provinieron de pacientes que consultan por esterilidad en la Unidad de Reproducción Asistida de Centro Médico Teknon, durante el periodo comprendido entre Junio y Octubre de 2006.

Cada muestra fue recogida en un frasco estéril entre 48 horas y no más de 7 días de abstinencia sexual, siempre por masturbación y sin utilizar lubricantes artificiales (WHO, 1999).

Las muestras fueron analizadas en la primera hora post-recolección siguiendo los criterios de la OMS (WHO, 1999), con valoración de la concentración espermática mediante Cámara de Neubauer Improved y estimación subjetiva de la movilidad.

En total se aceptaron 44 muestras cuya clasificación según los parámetros seminales OMS se muestra en la [Tabla I](#).

De cada muestra se utilizaron dos alícuotas que fueron procesadas independientemente mediante

Tabla I. Descripción de las características de las muestras procesadas

características seminales	n (=44)
normozoospermia	11
astenozoospermia	2
astenoteratozoospermia	10
oligozoospermia	2
oligoastenozoospermia	1
oligoteratozoospermia	3
oligoastenoteratozoospermia	3
teratozoospermia	12

la técnica de swim-up, e incubadas durante una o dos horas, respectivamente.

Las muestras se procesaron según el protocolo establecido en nuestro laboratorio (Solvas et al., 2002). Brevemente, 1,5 ml de medio de cultivo SpermRinse (Vitrolife,) se repartieron en 3 tubos de fondo cónico (Nunc., 347856) y en cada uno de ellos cuidadosamente se depositaron 0,25 ml de semen.

Los tubos se incubaron en posición inclinada a 37°C y 6% CO₂ durante el tiempo establecido tras lo cual los 2/3 superiores del sobrenadante se recogen en un único tubo. Se valoró la muestra recuperada (volumen, recuento y movilidad) y se calculó el REM.

Definimos REM como el recuento de espermatozoides con movilidad traslativa que se obtienen tras la técnica de preparación de semen. Así, REM-1 corresponde al número de espermatozoides móviles recuperados de la incubación de una alícuota durante 1 hora y REM-2 al número de espermatozoides móviles recuperados de la incubación de la otra alícuota durante dos horas.

Tras la incubación una persona distinta a la que preparó las muestras se encargó de estimar la movilidad espermática, obteniéndose así una valoración "a ciegas".

El análisis estadístico se realizó con el programa InStat de GraphPad,, que comparó los resultados obtenidos en una y dos horas de incubación, es decir, se comparó el REM-1 frente al REM-2 con el test U de Mann-Whitney y nivel de significación de $P \leq 0,01$.

RESULTADOS

La tabla II muestra las medias de los parámetros seminales de las muestras de semen procesadas y el rendimiento global obtenido con cada uno de los tiempos de incubación.

Como se ilustra en la tabla III, la

podía mejorar la calidad de la muestra de espermatozoides recuperados prolongando en 1 hora el periodo de incubación en el protocolo de swim-up, protocolo de capacitación con las mínimas manipulaciones posibles.

Tabla II. Media y desviación estándar (DS) de las variables seminales de las muestras procesadas y de los resultados de REM post swim-up

	Media	DS	mín.	máx.
volumen (ml)	3,9	0,8		
recuento espermático ($\times 10^6$ /ml)	72,9	122,0		
movilidad +++ (%)	17,8	3,5		
movilidad ++ (%)	32,3	3,5		
morfología (%)	12,8	3,5		
REM-1 ($\times 10^6$)	6,0	8,5	0,01	43,4
REM-2 ($\times 10^6$)	7,6	11,2	0,04	58,6

Tabla III. Análisis estadístico del REM-1 versus REM-2 en los grupos estudiados

	n	REM-1 ($\times 10^6$)	REM-2 ($\times 10^6$)	
todas las muestras	44	6,03	7,57	ns
normozoospermia	11	14,9	18,6	ns
oligozoospermia severa	3	0,07	0,23	ns
astenozoospermia severa	16	1,67	2,44	ns
teratozoospermia severa	11	1,81	2,63	ns

ns = estadísticamente no significativo

comparación de las medias de REM-1 y de REM-2 analizando el conjunto de todas las muestras no dio diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias cuando se analizaron subgrupos en función de la alteración seminal que presentara la muestra: oligo-, asteno- y teratozoospermia severa.

DISCUSIÓN

En este trabajo valoramos si se

Aunque se sabe que una incubación prolongada de los espermatozoides humanos puede tener efectos deletéreos sobre la función espermática, nuestro estudio no detecta diferencias en el REM, de manera que concluimos que un tiempo de incubación de 2 h no es tiempo suficientemente largo como para disminuir la calidad de los espermatozoides recuperados, pero tampoco para mejorarla.

En la literatura científica no he-

mos hallado estudios recientes sobre el efecto del tiempo de incubación en swim-up. Calamera et al., publicaron un artículo donde analizaban el efecto de la incubación prolongada en cuatro tiempos consecutivos (a las 1, 5, 23 y 47 horas) sobre diferentes variables (movilidad espermática, hiperactividad,

niveles de ROS...). Y centrándonos en la movilidad espermática en la segunda observación, a las cinco horas, ya detectan una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles que se acentúa a lo largo del tiempo de incubación (Calamera et al., 2001).

Nuestros datos no son comparables con los de Calamera et al., ya que nuestro intervalo de estudio (1 y 2 h) queda entre sus dos primeras observaciones (1 y 5 h) en un intervalo en el que no realizan valoraciones.

Podría pues argumentarse que se podría alargar el tiempo de incubación más allá de las 2 h pero menos de 5 h para obtener mejores rendimientos o bien para detectar efectos adversos (ya que en nuestro estudio no observamos diferencias), pero consideramos que esa opción carecería de interés práctico ya que no podría trasladarse a la rutina diaria de un laboratorio de FIV.

Como conclusión podemos afirmar que en el laboratorio de FIV, donde el tiempo es algo muy impor-

tante, no merece la pena una incubación prolongada de la muestra de semen sea cual sea la calidad de ésta puesto que en este trabajo no encontramos diferencias en la calidad de la muestra recuperada.

BIBLIOGRAFÍA

Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9:367-76.

Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 1990; 13:4533-51.

Andolz P, Bielsa MA. *Semen Humano (Atlas y manual)*. 1ª ed. Madrid: Editorial Garrisi; 1995. ISBN:84-7391-271-9.

Calamera JC, Fernández PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect *Andrologia* 2001; 33:79-86.

Inaudi P, Petrilli S, Joghtapour A, Trusso P, Petraglia F. Reduction of steps in the preparation of motile sperm for intrauterine insemination does not reduce efficacy of the procedure: simplified one-step swim-up method versus

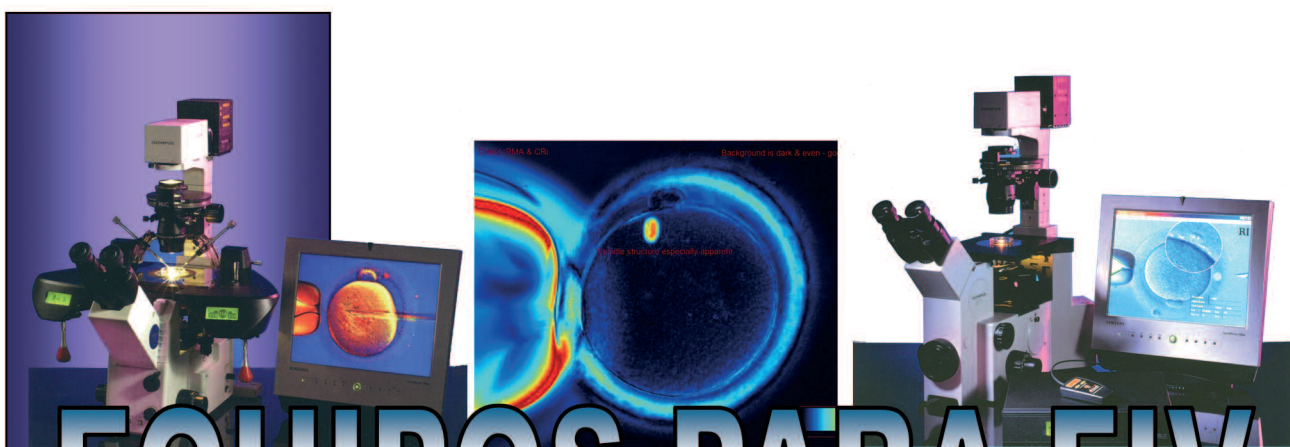
classic swim-up. *Hum. Reprod* 2002; 17:1288-91.

Jones R, Mann T, Sherins RJ. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*; 31:531-37.

Sakkas D, Manicardi GC, Tomlison M, Mandrioli M, Bizzarro D, Bianchi PG, Bianchi U. The use of two density gradient centrifugation techniques and swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 2000;15:1112-6.

Solvas I, Grossmann M, Santaló J, Pons MC. Estudio comparativo entre dos métodos de swim-up. *Revista ASEBIR* 2002; vol. 7 (2):28-32.

WHO. *Laboratory manual for the examination for human semen and sperm-mucus interaction*. 4th ed. Cambridge University Press; 1999. ISBN: 0-521-64599-9.0



EQUIPOS PARA FIV

Micromanipuladores, Laser, Oosight (Visu. Huso Meiotico)...



CONTROL DE CALIDAD

Medidores de PH, Volatiles, Particulas, Termómetros...



Quermed, s.a.

T 902102163 / F 915040440
quermed@quermed.com
www.quermed.com



MEDIOS DE CULTIVO

HTF, Vitricificación, Aceite...

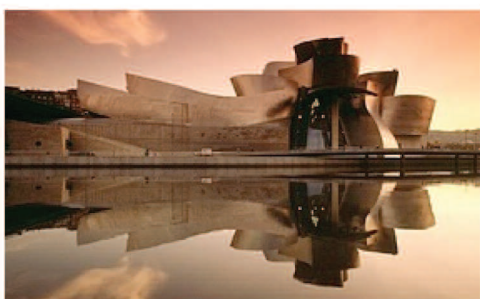
P R O G R A M A C O N G R E S O

Programa Congreso

28



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

**COMITÉ DE HONOR**

- Excm. Sra. Dña. Elena Salgado Méndez
Ministra de Sanidad y Consumo
- Excmo. Sr. D. Juan José Ibarretxe
Lehendakari del Gobierno Vasco
- Excmo. Sr. D. Gabriel Inclán
Consejero de Sanidad del Gobierno Vasco

COMITÉ ORGANIZADOR**Presidenta**

- Dra. Carmen Ochoa

Vocales

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

COMITÉ CIENTÍFICO

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

Secretaría ASEBIR

Telf.: +34 91 367 89 94
E-mail: asebir@asebir.com

Secretaría Técnica del Congreso
Grupo Process

Telf.: +34 91 377 14 23
E-mail: IVcongreso@asebir.com

PROGRAMA CIENTÍFICO PRELIMINAR

21 de noviembre (miércoles)

- **15:00 -20:00 h.** Apertura de secretaría para entrega de documentación.
- **16:00 h.** Inauguración del IV Congreso Nacional de ASEBIR.
 - Aurreku de Honor.
 - Inauguración por parte de autoridades, del Dr. Antonio L. González Utor, Presidente de ASEBIR y de la Dra. Carmen Ochoa, Presidenta del Comité Organizador.
 - A la inauguración han sido invitadas y esperamos la comparecencia de la Excm. Sra. Dña. Elena Salgado Méndez, Ministra de Sanidad y Consumo, el Excmo. Sr. D. Juan José Ibarretxe, Lehendakari del Gobierno Vasco, el Excmo. Sr. D. Gabriel Inclán, Consejero de Sanidad del Gobierno Vasco y el Excmo. Sr. D. Iñaki Azkuna, Alcalde de Bilbao.
- **17:00-20:30 h. GRUPOS DE INTERÉS ASEBIR.**
 - **17:00 h. CALIDAD EMBRIONARIA.**
Moderador: Dr. Fernando Prados
 - **17:00-17:15 h.** Clasificación ASEBIR de la calidad embrionaria. Estado actual.
Dr. Jorge Tén Morro
 - **17:15-17:30 h.** Normalización de datos de laboratorio de reproducción humana.
Dra. María José de los Santos
 - **17:30-17:45 h.** Proyectos de futuro del grupo de interés de calidad embrionaria.
Dr. Jorge Cuadros
 - **17:45-18:30 h.** Mesa redonda.
 - **18:30 h. DIAGNOSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP).**
Moderador: Dr. Carles Giménez
 - **18:30-18:45 h.** Realidad diagnóstica del DGP.
Dra. Esther Fernández
 - **18:45-19:00 h.** Gestión de calidad en los laboratorios de DGP.
Dr. Xavi Vendrell
 - **19:00-19:15 h.** Ensayo piloto de un programa de control de calidad externo para FISH en espermatozoides.
Dr. Juan Pablo Ramírez López
 - **19:15-19:30 h.** La nueva ley de reproducción asistida y sus implicaciones para el DGP.
Dra. Esther Velilla
 - **19:30-20:00 h.** Mesa redonda.
- **20:30 h.** Cocktail Inaugural en el Hall de Exposiciones del Palacio Euskalduna.

PROGRAMA CONGRESO

Programa Congreso

30

22 de noviembre (jueves)

MAÑANA

- **08:00- 14:00 h.** Apertura secretaría. Entrega de documentación y colocación de Póster.
- **09:00 h.** Apertura mesa electoral ASEBIR.
- **08:30-09:00 h. COMUNICACIONES ORALES (3).**
- **09:00-11:30 h. I SESIÓN: Investigación básica en embriología.**
 - **09:00- 09:30 h.** Sistema opioide y fertilidad masculina.
Dr. Jon Irazusta
 - **09:30-10:00 h.** Calidad ovocitaria: Importancia del diagnostico para el pronóstico y la decisión terapéutica.
Dr. Mario Sousa
 - **10:00-10:30 h.** La sélection des spermatozoïdes au grossissement de 6000X: IMSI.
Dr. Pierre Vanderzwalmen
 - **10:30-11:00 h.** Pluripotencialidad de las células madre embrionarias.
Dr. Ángel Raya
 - **11:00-11:30 h.** Discusión.
- **11:30-12:00 h.** Pausa. Café.
- **12:00-14:00 h. COMUNICACIONES ORALES (12).**
- **14:00-15:00 h.** Almuerzo
- **15:00-16:00 h.** Simposium satélite MediCult España.
Maduración de ovocitos In Vitro

TARDE

- **15:00- 19:30 h.** Secretaría.
- **16:00 -17:20 h. II SESIÓN: Laboratorio de embriología.**
 - **16:00- 16:30 h.** Marcadores no morfológicos de calidad embrionaria.
Dr. Marc Van den Bergh
 - **16:30-17:00 h.** Indicadores de calidad en el laboratorio de embriología.
Dr. Ernesto Veiga
 - **17:00-17:20 h.** Discusión.
- **17:20-17:40 h.** Pausa (Visita stands y póster).
- **17:40-20:00 h. III SESIÓN: Relación Clínico-Embriológica.**
 - **17:40-18:10 h.** Tipos de tratamientos de estimulación ovárica y motivos de selección.
Dr. Francisco Fábregues
 - **18:10-18:40 h.** Infertilidad de causa genética.
Dr. Rafael Oliva
 - **18:40-19:10 h.** Métodos contraceptivos y fertilidad posterior.
Dr. Ezequiel Pérez
 - **19:10-19:40 h.** Resultados SEF 2004.
Dr. José Antonio Castilla
 - **19:40-20:00 h.** Discusión.
 - **18:30 h.** Cierre mesa electoral ASEBIR.
 - **20:30 h.** Visita privada Museo Guggenheim.
 - **22:00 h.** Cena Congresual Gran Hotel Dómine Bilbao.

23 de noviembre (viernes)**MAÑANA**

- **08:00-14:00 h.** Apertura de secretaría.
- **08:30-09:30 h. COMUNICACIONES ORALES (6).**
- **09:30-11:00 h. IV SESIÓN: Aspectos jurídicos de los tratamientos de reproducción asistida humana.**
 - **09:30-10:00 h.** Ley 17/2006 sobre técnicas de reproducción asistida humana y Real Decreto 1301/2006. Límites y controversias.
Dr. Fernando Abellán
 - **10:00-10:30 h.** Directivas del Parlamento Europeo y del Consejo 2004/23/CE y 2006/17/CE, relativas a las normas y requisitos técnicos para la donación y distribución de células y tejidos humanos. Y su relación con las recomendaciones de las sociedades científicas Europeas.
Dr. Vicente Jasa
 - **10:30-11:00 h.** Discusión.
- **11:00-11:30 h.** Pausa. Café.
- **11:30-13:00 h. ASAMBLEA ASEBIR y presentación nueva Junta Directiva.**
- **13:00-14:00 h. COMUNICACIONES ORALES (6).**
- **14:00-15:00 h.** Almuerzo
- **15:00-16:00 h.** Simposium satélite EMB-Vitrolife
Human embryo culture and vitrification

TARDE

- **16:00-16:30 h. AULA VIRTUAL: Métodos de fijación de blastómeras tras biopsia embrionaria.**
Dra. Carmen Rubio
- **16:30-17:30 h. COMUNICACIONES ORALES (6).**
- **17:30-17:45 h.** Pausa (visita stands y póster).
- **17:45-18:45 h. V SESIÓN: DEBATE: Diferentes métodos de cultivo embrionario.**
Dra. Olga Cairó
Dr. Nicolás Prados
- **18:45-19:00 h.** Exposición Premio ASEBIR-EMB 2005.
- **19:00-19:30 h.** Entrega Premios ASEBIR-EMB 2007.
 - ASEBIR-EMB de Investigación Básica en Embriología.
 - ASEBIR-EMB de Embriología Clínica.
- **19:30-20:00 h.** Clausura del IV Congreso Nacional de ASEBIR.
- **21:00 h.** Cena de Clausura en los salones de la Sociedad Bilbaína.

Vitrolife

Innovative Cell and Tissue Technology



EMIB
GRUPO



K

IVF Workstation L24



Introducción a Debate

En este número incluimos opiniones sobre el tema propuesto “¿Estamos realizando ciclos de ICSI y de DGP más allá de sus indicaciones contrastadas?”. Y para el próximo número nuestra propuesta a debate se centra

en la **Clasificación Morfológica Embrionaria** propuesta en el segundo cuaderno ASEBIR de embriología clínica, e invitamos a todos aquellos equipos que ya la estén usando a que nos cuenten su valoración de los primeros 100

días. Desde la vocería de publicaciones os invitamos a participar en este tema o en los anteriores: recordad que una vez planteado un tema permanece siempre abierto a nuevos comentarios.

La FIV convencional goza de buena salud

Jorge Cuadros, Paloma Sánchez-Aparicio, Lara Andrés, Marta Sánchez de Burgos
Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología FIV-Madrid.

Según el Registro SEF 2003, en dicho año el 63,8% de las punciones realizadas fueron sometidas a ICSI. Este número aumenta al 73,8% si se incluyen los ciclos en los que se realiza FIV convencional (FIVc)+ICSI. Se podría suponer que a fecha de hoy, este porcentaje sería aún mayor.

De ahí que algunos compañeros, embriólogos o médicos, afirmen que se podría estar abusando del uso de la ICSI; es decir, utilizándola sin una indicación específica. Pero ¿cuáles son las indicaciones específicas de la ICSI? principalmente, factor masculino, algunos casos de factor femenino y el miedo al fallo de fecundación por FIVc. Del mismo Registro SEF 2003, se observa que con la FIVc se realizó la transferencia embrionaria en el 90,4% de los casos, mientras que con la ICSI se realizó la transferencia en el 93,2% de los casos.

Asumiendo que, proporcionalmente, los ciclos en los que no se realizaría la transferencia por la congelación de todos los embriones serían los mismos con las dos técnicas, se deduce que hay un número mayor de fallos de fecundación por FIVc. Dadas las cifras del Registro, la diferencia entre el número de transferencias por punción realizada entre FIVc e ICSI es estadísticamente significativa.

Además, dado que los fallos de fecundación por ICSI son extremadamente raros, lo más probable es que estos datos se deban a ciclos en los que se habría microinyectado un número inferior a 3 oocitos. Por otra parte, algunos de los reparos frente a la ICSI todavía se podrían relacionar con el efecto que pudiera tener la técnica sobre los niños nacidos. Sin embargo, diversos estudios, como los realizados por Maryse Bonduelle en la Universidad Libre de Bruselas demuestran que no hay dife-

rencia en el desarrollo psicomotor entre los niños nacidos por ICSI y los nacidos por FIVc (Bonduelle et al., 2003), ni diferencia en el porcentaje de malformaciones congénitas entre estas dos técnicas (Bonduelle et al., 2002), siendo en ambos casos superior al de los nacidos por concepción espontánea, lo que indica que la mayor probabilidad de anomalías se debería a características de los pacientes (o, en opinión de algunos expertos, a la estimulación ovárica) y no a la técnica utilizada para la fecundación.

En un estudio reciente de este grupo, el seguimiento hasta los 8 años de edad de niños nacidos por ICSI demuestra que el desarrollo cognitivo y motor de estos niños es similar al de los nacidos por concepción espontánea (Leunens et al., 2006). Por otra parte, algunos estudios han sugerido que los embriones de FIVc son de mejor calidad que los de ICSI. Pero en estos trabajos se suele comparar FIVc con normozoospermia versus ICSI con factor masculino severo.

Por lo tanto, las razones que explicarían por qué estamos “abusando” de la ICSI serían:

-Evitar los casos inesperados de fallo de fecundación por FIVc. Los fallos de fecundación por ICSI son anecdóticos.

-Del Registro SEF 2003 también se deriva que, si las tasas de embarazo, aborto y embarazos múltiples son similares entre la FIVc y la ICSI, la potencialidad de los embriones provenientes de ICSI no es diferente, teniendo en cuenta además que en estos casos suele haber un factor masculino severo.

-Estudios realizados durante los últimos años han demostrado que los niños naci-

dos por ICSI tienen la misma probabilidad de malformaciones congénitas que los de FIVc, y que su desarrollo motor y cognitivo es similar al de los niños nacidos por concepción espontánea.

-Finalmente, en nuestra experiencia, las tasas de fecundación por ICSI siempre han sido superiores a las de la FIVc, por lo que, en cada ciclo, microinyectar implica tener más embriones para seleccionar, lo que consideramos es fundamental para el éxito del procedimiento. Es decir, la FIVc goza de buena salud, sin duda, pero la ICSI no representa desventaja alguna y en la práctica, salvo anécdotas, asegura que en cada ciclo tengamos embriones para transferir.

Bibliografía

Bonduelle M; Ponjaert I; Van Steirteghem A; Derde M-P; Devroey P; Liebaers I. Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born after IVF. Hum Reprod 2003; 18:342-350.

Bonduelle M; Liebaers I; Deketelaere V; et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). Hum Reprod 2002; 17:671-94.

Leunens L; Celestin-Westreich S; Bonduelle M; Liebaers I; Ponjaert-Kristoffersen I. Cognitive and motor development of 8 year-old children born after ICSI compared to spontaneously conceived children. Hum Reprod 2006; 21:2922-29.

Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad (Registro SEF), año 2003.

FIV versus ICSI ¿SE USAN DE MANERA RACIONAL?

Carmen Ochoa
Clínica Euskalduna, Bilbao

A principio de la década de los 80, cuando en nuestro país se comenzó a trabajar en Fecundación In Vitro (FIV), los grupos que a ello nos dedicábamos íbamos ampliando la indicación originaria de obstrucción tubárica con la intención de dar solución a los problemas de esterilidad que presentaban “nuestras” parejas.

La Fecundación In Vitro, conseguía solucionar muchos déficits reproductivos y consiguió que muchas parejas tuvieran hijos genéticamente propios en situaciones que en otro momento no hubiera sido posible. Pero no todo era solucionable.

Los defectos de fecundación comenzaron siendo uno de los problemas que ocurrían con una relativa frecuencia, sobre todo cuando ampliamos la indicación del procedimiento al factor masculino. Surgieron todos los estudios y test, que intentaban relacionar los datos del seminograma con la probabilidad de conseguir fecundación de los ovocitos inseminados en una FIV, intentamos saber si era la motilidad, la morfología o el recuento espermático, el dato que tenía un valor más futurible respecto a este resultado. Surgieron los test que intentaban valorar la fisiología espermática y su capacidad de fecundación, como fueron el test de Hamster, el HOS test, el test de fecundación de los ovocitos humanos no vivos e incluso la FIV fue considerada como un test en sí misma, en realidad intentábamos valorar la interacción ovocito-espermatozoide, con la intención de dar un dato pronóstico al ciclo de FIV.

En 1992, Palermo et al., publicaban en la revista “THE LANCET” el primer embarazo, gemelar, que se consiguió tras inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en

un óvulo. Este hecho supuso un importantísimo avance a uno de los problemas que venían aconteciendo en los tratamientos de reproducción asistida, como eran los defectos de fecundación en la FIV. Prácticamente ya no existían fracasos de fecundación, podíamos hablar de que la técnica conseguía que más que el 90% de las parejas que se sometían a un ciclo de ICSI tuvieran algún tipo de transferencia de embriones, y se la atribuían tasas de fecundación de alrededor del 66%.

Al hilo de los conocimientos que nos aportó la ICSI y de sus posibilidades terapéuticas, fueron publicados, en 1995 por Silver et al., los resultados que proporcionaba la técnica en el caso de las azoospermias tanto obstructivas como secretoras, obteniéndose los espermatozoides del testículo y/o del epidídimo, en relación a las tasas de fecundación y a las posibilidades de embarazo. Habiendo demostrado previamente (Silver et al., 1994) que la ICSI proporcionaba mayor tasa de fecundación que la FIV, en este colectivo de pacientes.

Nadie puede poner en duda lo que aportó la ICSI a la esterilidad de la pareja en general, y al factor masculino en particular. Nadie puede dejar de indicar una ICSI ante un diagnóstico de presencia de anticuerpos antiespermatozoides, de azoospermia, de oligo-asteno-teratozoospermia etc.

Pero no tiene porqué ser una técnica que eclipse a la FIV convencional: cada una tiene sus indicaciones. No debemos olvidar que la ICSI no consigue más tasa de niño en casa que la FIV, ni tampoco consigue más tasa de fecundación cuando extrapolamos esta técnica a la generalidad de parejas que necesitan un tratamiento de reproducción asistida, ni tampoco

consigue un mayor número de transferencias frente a la FIV... si esta última está bien indicada.

Los datos de nuestro grupo en cuanto a tasa de fecundación en la FIV, siempre en parejas cuidadosamente diagnosticadas y por tanto seleccionadas, frente a los datos de fecundación en ICSI son muy parecidos (77% versus 82 %), diferencia que desaparece entre ambos resultados cuando la tasa de fecundación en FIV la calculamos respecto al número de ovocitos en MII, como se hace en la ICSI, en lugar de frente al total de ovocitos inseminados. Lo mismo ocurre cuando valoramos los defectos de fecundación que ocasionan no transferencia de embriones, siendo en la primera técnica del 2,5% y del 2,1% en la segunda, diferencias que no fueron estadísticamente significativas.

Y por último, la tasa de embarazo por transferencia, según los datos publicados por la SEF en el registro de 2003 son también muy parecidos (36,8% versus 36,1%).

A la vista de lo expuesto cada grupo podrá utilizar la técnica que se adapte más a su estructura de trabajo o su criterio personal, pero lo que no se puede es usar la ICSI disminuyendo la valía de la FIV, no en base a los actuales resultados que aportan ambas técnicas.

No olvidemos un principio médico y biosanitario fundamental que dice: “primero diagnosticar y después tratar y siempre hacerlo de menos a más”.

Bibliografía

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.

Lancet 1992; 340:17-8.
Registro SEF 2003: Estudio SEF.
Registro FIV-ICSI de la Sociedad
Española de Fertilidad. Año 2003.

Silver SJ., Nagy Z., Liu J., Godoy H.,
Devroey P., Van Steirteghem AC.
Conventional IVF versus ICSI for

patients requiring microsurgical
sperm aspiration. Hum.Reprod
1994; 9:1705-09.

Silver S., Van Steirteghem AC., Liu J.,
Nagy Z., Tournaye H., Devroey P. High
fertilization and pregnancy rates after
ICSI with spermatozoa obtained from

testicle biopsy. Hum.Reprod 1995;
10:148-52.

Entendemos por Guía de Práctica
Clínica (GPC) el conjunto de recomen-
daciones desarrolladas de manera sis-
temática, con el objetivo de guiar a los
profesionales y a los enfermos en el
proceso de toma de decisiones sobre

¿ QUÉ LE OCURRE A LA FIV CONVENCIONAL HOY EN DÍA?

MCarme Pons, Mark Grossmann

Unidad de Reproducción Asistida. Centro Medico Teknon, Barcelona. ura@cmteknon.com

Cuentan los embriólogos seniors (y lo refrenda la literatura científica) que corría el año 1977 cuando se logró el primer nacimiento a partir de un embrión humano fecundado en el laboratorio. Para aquella hazaña se usó lo que se llamaría fecundación in vitro convencional (FIVc).

Transcurridos los años y cambiado el milenio ¿alguien recuerda hoy qué es la inseminación de los ovocitos? ¿A veces parece que no!

Resulta que en la década de los años 90 se describió una técnica que permitió inyectar espermatozoides (incluso inmóviles y/o morfológicamente aberrantes) en el citoplasma de un ovocito mediante un sofisticado y caro sistema de micromanipulación: y a tanta modernidad se la llamó ICSI.

Evidentemente la ICSI es la técnica de obligada elección en los casos de esterilidad por factor masculino y en los fallos de fecundación en algún ciclo previo de FIVc. También en los casos de Diagnóstico Genético Preimplantacional mediante PCR u otros protocolos moleculares, y en todos

ellos funciona muy bien. ¿Pero qué ocurre con todos los demás casos? A pesar de que la FIVc es una técnica mucho menos agresiva, con muchos más años de demostrada eficacia, con más datos en el seguimiento de los bebés nacidos y mucho más fácil (tanto en procedimiento, como en tiempo y costes), detectamos que va perdiendo adeptos a pasos agigantados y que cada vez son menos y menos y menos los ciclos de FIVc que se realizan en nuestro país, a diferencia de lo que ocurre en otros países europeos en donde la FIVc mantiene su cuota estable.

¿Qué le pasa a nuestra FIVc hoy en día? Pues quizás que sufre del síndrome del "miedo al fracaso". Es cierto que el porcentaje de ciclos con fallo completo de fecundación es más alto en FIVc que en ICSI... aunque ¿alguien sabe si estas diferencias son estadísticamente significativas? Probablemente no lo sean.

Y mucho más definitivo ¿la tasa de niño/a en casa es más alta en los ciclos de FIV-ICSI que en los de FIVc? Las revisiones Cochrane (The Cochrane Library 2003; van

Rumste et al., 2004) no muestran superioridad alguna de la ICSI sobre la FIVc ni en la tasa de fecundación, ni en la de implantación ni en la tasa de niños/as en casa.

Y la práctica clínica debería sustentarse en la evidencia.

De la misma manera que la ICSI demostró su utilidad en unas patologías muy concretas, pensamos que para las demás debería plantearse la FIVc como primera opción en lugar de optar directamente a FIV-ICSI.

Alternativamente, en los casos con eyaculados en el límite de la normalidad se podrían programar ciclos mixtos de FIVc + FIV-ICSI y así, usando estas estrategias, se conservaría el valor diagnóstico del ciclo de FIV.

Además, tanto la tasa de fecundación después de inseminación o la tasa de fallo completo pueden usarse como indicadores de calidad dentro de un equipo de

Reproducción Humana Asistida y son parámetros mucho más sensibles que los mismos pero obtenidos de los ciclos de FIV-ICSI.

Así pues, y en nuestra opinión, no hay base científica que justifique anteponer la FIV-ICSI a la FIVc, tal y como está ocurriendo en muchos de nuestros centros.

Bibliografía

van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM. (2003) Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003.

van Rumste MM, Evers JL, Farquhar CM. ICSI versus conventional techniques for oocyte insemination during IVF in patients with non-male subfertility: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2004; 19:223-7.

GUÍAS DE PRÁCTICA CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL

Gonzalvo MC, Clavero A, Calderón S, Sánchez-León A, Pérez M, L, González ML, Alonso A, Castilla JA
Unidad de Reproducción. HU Virgen de las Nieves, Granada

qué intervenciones sanitarias son más adecuadas en el abordaje de una condición clínica específica en circunstancias sanitarias concretas.

La necesidad de diseñar una GPC está determinada por diferentes factores, entre los que destacan: presencia de variaciones en la prescripción y/o utilización de diferentes intervenciones sanitarias en el abordaje de condiciones clínicas específicas, variabilidad en el consumo de recursos sanitarios, necesidad de elaborar criterios de idoneidad, desarrollo de estándares de calidad asistencial, incertidumbre en la determinación de los resultados clínicos esperados e incertidumbre en la práctica clínica y las dificultades para asimilar de manera crítica el inmenso volumen de información disponible en la literatura científica.

Actualmente son la base sobre la que se debe asentar la medicina moderna. Su importancia en nuestro entorno es tal que el pleno del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud de 26 de marzo de 2003 acordó implantar y desarrollar el Proyecto Guía-salud, con el

objetivo de estimular el acceso y la utilización de las GPC, desarrollando redes para la implantación de guías y establecer una cultura de comparación y de buena práctica. Este proyecto es uno de los pilares del Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud de abril de 2007.

Por otra parte, si analizamos el registro de técnicas de reproducción asistida de la Sociedad Española de Fertilidad de 2003 podemos deducir que un elevado porcentaje (20%) de las indicaciones de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) fue la existencia de un factor masculino severo, que corresponde a unos 200 ciclos (aunque no existe esta categoría en dicho registro queda englobada en "otras indicaciones"). Si analizamos el registro del Consorcio de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) sobre DGP de 2003, un 6% de las indicaciones fue factor masculino severo, lo que corresponde a 188 ciclos. Parece por tanto que entre un 6 y un 20% de los ciclos de DGP que se realizan son por factor masculino severo.

Sin embargo, tras analizar diferentes GPC (Tabla I) de diagnóstico y tratamiento de la esterilidad por factor masculino, ninguna indica dicha técnica como opción terapéutica válida para la atención a la pareja estéril por factor masculino severo. Creemos por tanto, que este ejemplo, probablemente aplicable a otras indicaciones de DGP como edad materna o abortos de repetición sirva para entender que el tratamiento de la esterilidad no debe de ir al margen de lo que el mundo científico y las autoridades sanitarias consideran una de las herramientas más útiles en la mejora de la calidad sanitaria, como son las GPC. Por tanto, mientras que no exista, al menos una GPC que indique el DGP en esterilidad por factor masculino severo, creemos que dicha indicación no es adecuada.

Tabla I Guías de Práctica Clínica de esterilidad por Factor Masculino

www.auanet.org Report on management of obstructive azoospermia. American Urological Association, 2001

www.auanet.org Report on evaluation of the azoospermic male. American Urological Association, 2001

www.uroweb.org Guidelines on male infertility. European Association of Urology, 2004

www.emqn.org European Academy of Andrology (EAA) / European Molecular genetics Quality Network (EMQN) best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004;27:240-249

www.cua.org. The work-up of azoospermic males. Canadian Urology Association, 1998

www.cfas.com. Canadian Fertility and Andrology Society. Consensus Document for the Investigation of

Infertility; 2002.

www.guideline.gov. Brigham and Women's Hospital. Infertility. A guide to evaluation, treatment and counselling. Boston (MA): Brigham and Women's Hospital; 2003.

www.guideline.gov. Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI). Diagnosis and management of basic infertility. Bloomington (MN): Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI); 2004.

www.guideline.gov. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Commissioned by National Institute for Clinical Excellence. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. London: RCOG Press; 2004.

Bibliografía

Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad (Registro SEF), año 2003.

ESHRE PGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum. Reprod* 2007, vol 22 (2), 323-336.

¿ SE ESTÁ APLICANDO EL DGP DE FORMA ABUSIVA?

Fanny Vidal

Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències.
Universitat Autònoma de Barcelona. francesca.vidal@uab.cat

Desde su primera aplicación clínica en 1990, el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) aparece en el programa de prácticamente todos los Congresos y reuniones científicas que tratan de reproducción asistida.

A lo largo de los años, su uso se ha extendido, la lista de indicaciones se amplía continuamente y el número de casos en los que se utiliza crece de forma exponencial.

La aplicación del DGP está necesariamente ligada a la fecundación in vitro (FIV o FIV-ICSI) para la obtención de los embriones susceptibles de ser analizados. No obstante, las

tornas están cambiando y percibimos que, cada vez más, es la FIV la que parece depender del DGP. A partir de este punto surge la controversia.

La creciente indicación de DGP para ciertos grupos de pacientes (aborto de repetición, fallos previos de ciclos de FIV, edad materna, anomalías de la meiosis masculina, etc...), con el objetivo de llevar a cabo un estudio cromosómico que nos permita una mejor selección de los embriones a transferir, sirve de partida para la discusión.

En algunos casos, el debate se dirige a la sempiterna disputa sobre la denominación que debemos dar al tipo de

análisis que estamos realizando.

En este aspecto, no considero en absoluto necesario dedicar esfuerzos en establecer si los estudios de aneuploidías merecen ser incluidos bajo el término "DGP" o deben ser obligatoriamente nombrados con epígrafes alternativos (screening de aneuploidías, PGS, AS, ...) que para algunos colegas conllevan un cierto deje de menosprecio.

Según mi opinión, lo importante es identificar claramente el tipo de estudio que se lleva a cabo en cada caso y que los resultados obtenidos se presenten de forma comprensible para poder extraer las conclusiones oportunas.

El carácter de la discusión toma un cariz distinto cuando se orienta hacia los resultados clínicos derivados de la aplicación del DGP para los estudios de aneuploidías. La gran mayoría de centros que llevan a cabo un gran número de ciclos defienden su aplicación y presentan datos que apoyan su uso con tasas de embarazos y abortos que lo justifican.

Por otra parte, si evaluamos las recopilaciones de resultados (ESHRE PGD Consortium), elaboradas a partir de los datos aportados por centros diversos, se observa que no reflejan porcentajes tan positivos. Es evidente que los resultados de un solo laboratorio nos ofrecen una

visión sesgada. Por otra parte, la heterogeneidad de las recopilaciones suele distorsionar los resultados al no considerar aspectos como el criterio de selección de las parejas de los diversos centros, los resultados generales de FIV de cada laboratorio, aspectos técnicos de la realización de las biopsias embrionarias o la experiencia del laboratorio que lleva a cabo el diagnóstico.

Puntos como los pocos estudios randomizados "de verdad", la heterogeneidad de los grupos de pacien-

tes, los resultados dispares en ciclos repetidos, el número de ciclos sin transferencia o el coste del diagnóstico suelen ser puntales para la discusión de los "no creyentes". Mientras que, en la esquina opuesta, se nos presentan resultados y porcentajes de efectividad que deben ser observados de forma sensata y tratados con la consideración que merecen.

En resumen, hay argumentos válidos para ser esgrimidos tanto por los defensores a ultranza del DGP como para sus detractores más acérrimos.

Es evidente que estas diferencias son difíciles de dirimir e incluso resulta curioso que el mismo argumento pueda ser utilizado para justificar la postura de los dos grupos en discusión (como por ejemplo el elevado número de anomalías cromosómicas observadas en los embriones analizados).

No obstante, no deja de sorprender que gran parte de las opiniones críticas hacia el uso del DGP para mejorar los resultados de FIV no provenga de resultados negativos obtenidos después de su aplicación sino de la "lectura y re-análisis" de los resultados que han presentado los grupos que justifican su uso.

La controversia y la división de opiniones respecto a la aplicación del

DGP se mantienen desde sus inicios pero el debate se ha intensificado en los últimos tiempos. Mantengamos el debate abierto, busquemos argumentos, que los centros evalúen los resultados que están obteniendo y los presenten a discusión (ASEBIR es un foro excelente).

Finalmente, seamos consecuentes con los resultados obtenidos y recordemos que el DGP no sustituye al diagnóstico prenatal. Es evidente que el uso indiscriminado del DGP va en su propio detrimento, ya que los resultados no se ajustan a las expectativas creadas. Quizás un cierto uso extensivo (¡no abusivo!) durante un periodo servirá para que podamos ubicar al DGP en el lugar que le corresponde.

Pregunta inicial: ¿Se está aplicando el DGP de forma abusiva?

Respuesta: ¡Tengo el corazón partido!

Pregunta abierta a la reflexión:

¿Estamos siendo más críticos con el uso del DGP de lo que hemos sido en su momento con otras técnicas en reproducción asistida (ICSI, TESE, ROSI, ...) o la propia FIV?



Somos los primeros
en conocerte ...

www.centromedicinaembrionaria.com

SERVICIOS

Diagnóstico genético preimplantacional

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

Estudio genético de la infertilidad masculina

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

Servicio de Diagnóstico Genético Preimplantacional

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

Servicio de Andrología

Dr. Ferran García José

Asesor Científico

Dr. Prof. Juan G. Álvarez

OTROS SERVICIOS

Biopsia embrionaria y fijación de blastómeros

Consejo Genético

Formación en biopsia y fijación

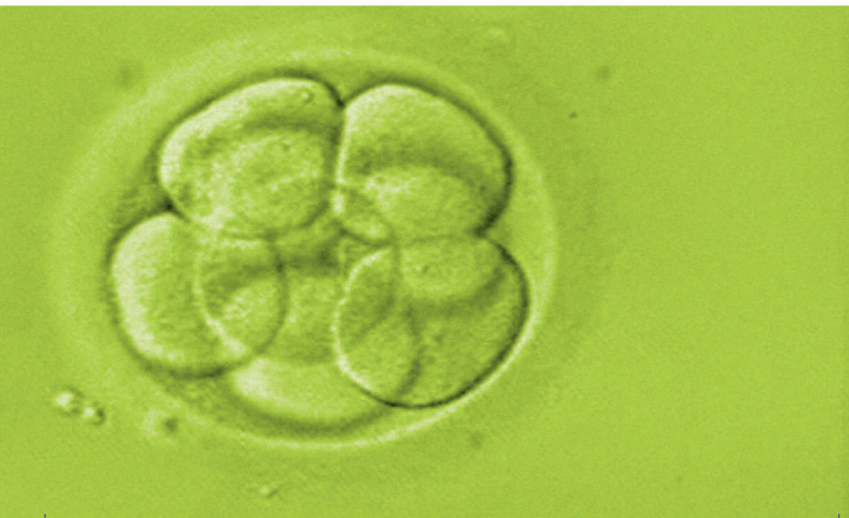
Álvarez de Baena, 4 · 28006 Madrid · Tf. 91 4115080
Fax 91 411 50 81 · dgpi@centromedicinaembrionaria.com



centro de medicina
embrionaria

www.centromedicinaembrionaria.com

... y sabemos que
crecerás sano



PAPEL DE LA INTERACCIÓN CELULAR EN FOLICULOGÉNESIS

The role played by cell interaction in folliculogenesis

Paloma Sánchez-Aparicio¹, Ricardo Ramos² y Jorge Cuadros¹

¹Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología, Fiv Madrid, Madrid. ²Unidad de Genómica, Parque Científico, Universidad Autónoma, Madrid.

Correspondencia: Paloma Sánchez-Aparicio: aparicio@fivmadrid.es

Correspondencia: Ignacio Santiago Álvarez Miguel: isalvarez@iera.es

Resumen: El proceso de crecimiento y maduración folicular que conlleva a la formación de gametos femeninos funcionales se denomina foliculogénesis. Este proceso está estrictamente regulado de forma endocrina y paracrina. Además, las interacciones celulares, tanto célula-célula como célula-MEC (matriz extracelular), desempeñan un papel fundamental. En concreto, el correcto diálogo intercelular controla la adecuada maduración oocitaria. Este artículo es una revisión de los principales mecanismos de interacción celular así como las familias de moléculas de adhesión implicadas.

Palabras Clave: adhesión, interacción celular, foliculogénesis

Abstract: The process of follicular growing and maturation which leads to the formation of functional female gametes is named folliculogenesis and is subject to a strict endocrine and paracrine regulation. In addition, cell interactions (cell-cell and cell-ECM) play an essential role in this process. In particular, the proper maturation of oocytes is controlled by a correct intercellular dialogue. This review focuses on the main mechanisms of cell interaction as well as the most important families of adhesion molecules involved.

Key Words: adhesion, cell-cell interaction, folliculogenesis

Regulación funcional del ovario

El proceso de foliculogénesis tiene lugar en los ovarios y asegura la formación de gametos femeninos funcionales (oocitos) que están diseñados para transmitir la carga genética a la siguiente generación. Los gametos, que son haploides, darán lugar a un cigoto diploide cuyas células proliferarán y terminarán por diferenciarse.

En la cavidad peritoneal se encuentran los ovarios cuya arquitectura tisular es sencilla: en cada uno de ellos se distingue una región cortical y un estroma medular central. Asimismo, el tejido ovárico está constituido por células germinales,

células epiteliales superficiales circundantes y células de estroma -células de tejido conectivo y productoras de hormonas-. Las células germinales darán lugar a los oocitos mientras que el resto de las células están implicadas en la creación del microambiente adecuado que garantiza el correcto desarrollo oocitario. Desde la pubertad hasta la menopausia, el ovario se caracteriza por tener una estructura dinámica donde los folículos ováricos están en continuo desarrollo. Los folículos se sitúan en la región cortical del ovario y están en evolución continua a partir del estadio primordial. Los folículos primor-

diales se forman, en su totalidad, durante el desarrollo prenatal y están constituidos por un oocito detenido en profase de la primera división meiótica y una capa de células somáticas planas circundantes (Lei et al., 2006). Durante un periodo variable, los folículos primordiales están en estado de quiescencia (Fortune et al., 2000). La mayoría permanecen en este estado hasta que degeneran o se activan por señales específicas que les hacen entrar en fase de crecimiento, sufriendo entonces un dramático proceso de proliferación y diferenciación (Figura 1).

Aunque los mecanismos concretos

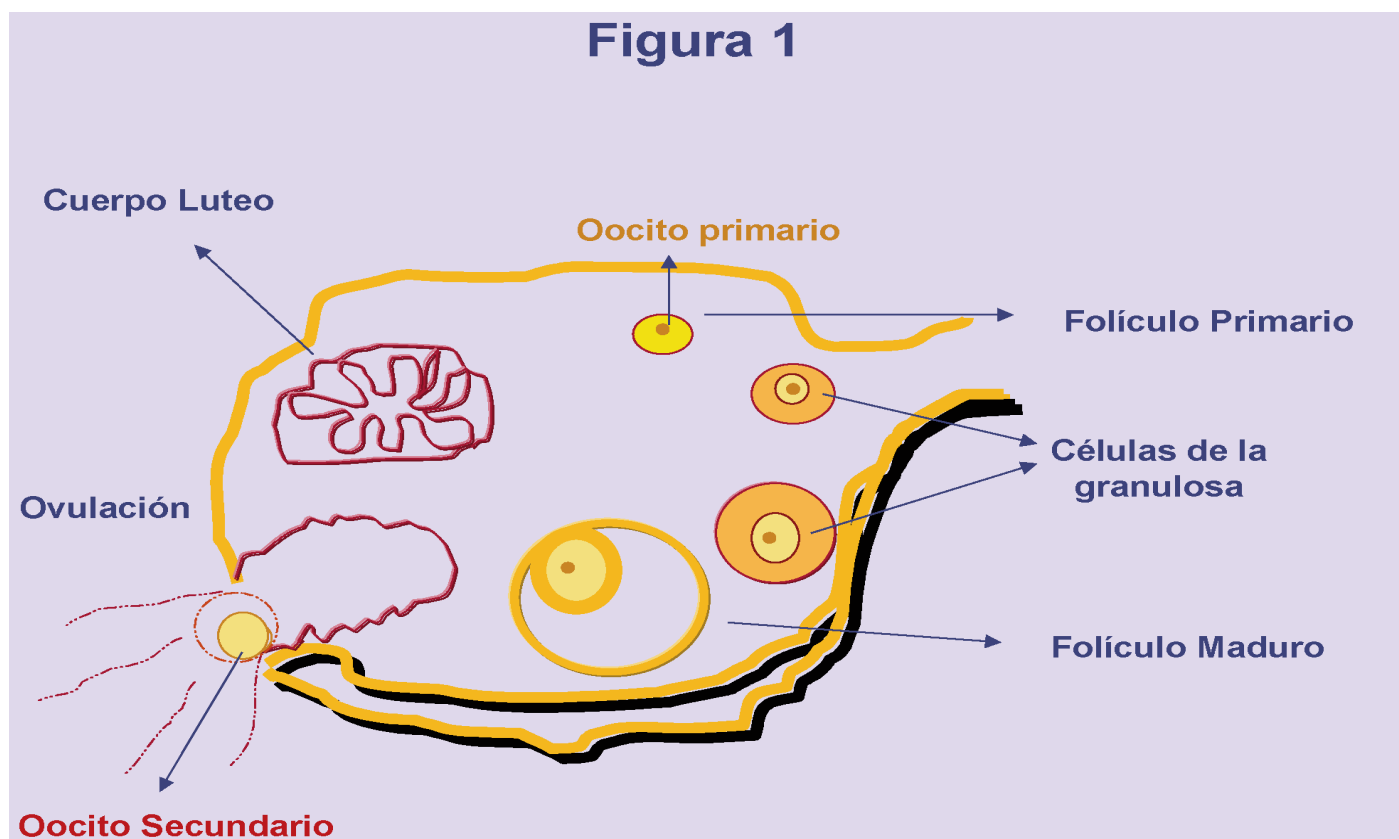


Figura 1. Representación esquemática del ovario. Los folículos primordiales, que se forman durante el desarrollo prenatal y permanecen en estado de quiescencia durante largo tiempo, están constituidos por un oocito detenido en profase de la primera división meiótica y una capa de células somáticas planas. Se habla de folículo primario cuando un folículo primordial ha abandonado su estado de quiescencia y las células de la granulosa empiezan a crecer y diferenciarse. El proceso de crecimiento y maduración folicular se denomina foliculogénesis y culmina con la ovulación. Durante este proceso, el oocito primario, que está detenido en profase, avanza en su división meiótica. Finalmente, se produce la liberación del primer corpúsculo polar al finalizar la primera división meiótica y se inicia la segunda división meiótica, deteniéndose el oocito en metafase. En este estadio tiene lugar la ovulación.

que bloquean o inician el crecimiento de los folículos primordiales en estado quiescente no se han establecido con exactitud, el conocimiento de los genes que se expresan podría ayudar a entender los mecanismos de regulación de este proceso (Kocabas et al., 2006; Yoon et al., 2006).

Dicho proceso de crecimiento y maduración folicular constituye la foliculogénesis y culmina con la ovulación en cada ciclo ovárico durante el periodo reproductivo. El ovario además de estar implicado en la producción de gametos desempeña una función endocrina esencial. La producción de hormonas esteroideas está, a su vez, implicada en la propia generación de gametos por parte del ovario. Dicha producción hormonal está bajo el control del eje hipotálamo-hipofisario, con

mecanismos de control estrictamente regulados (regulación endocrina).

Los ovarios disponen además de sistemas de regulación locales; esto es, células cuyas secreciones se autorregulan (regulación autocrina); y células cuyas secreciones se producen para intervenir en el control de células vecinas de la misma gónada (regulación paracrina). Por tanto, las células de los ovarios responden al ambiente externo y a las señales de otras células; la correcta producción de gametos depende de la acción combinada de este complejo sistema de secreciones. Las señales que reciben las células del tejido ovárico son trasladadas a diferentes partes de la propia célula, incluido el núcleo (Pangas et al., 2000).

Estas vías de transducción de se-

ñales acaban regulando el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación, la migración y el metabolismo celular, y por tanto la transcripción de un número considerable de genes. En todo este proceso, los oocitos avanzan en su estado madurativo y simultáneamente las células de la granulosa desarrollan capacidades esteroideas específicas.

En etapas iniciales, se han descrito numerosos factores intra-ovario, miembros de distintas familias de factores de crecimiento que influyen en el crecimiento y la maduración folicular a través de la señalización paracrina (Hernández et al., 1991, 1992; Matzuk et al., 2002). Sin embargo, los estadios tardíos del desarrollo folicular son dependientes de las hormonas hipofisarias FSH (hormona folículo estimulan-

te) y LH (hormona luteinizante) (Shimada et al., 2002); la primera es el mayor promotor de la maduración folicular aumentando la proliferación de las células de la granulosa y regulando la producción de la hormona estradiol (hormona esteroidea), la segunda juega un papel destacado en estadios avanzados del desarrollo folicular, estimulando la maduración del oocito, la ovulación y el proceso de luteinización. A su vez, los factores de crecimiento producidos por los propios folículos son capaces de modular, amplificando o atenuando, la acción de la hormona FSH (Adashi et al., 1993).

En definitiva, el proceso de la foliculogénesis está regulado por mecanismos intra-ovario y endocrinos que coordinan el proceso de crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Peramo et al., 2002). En el interior del folículo las interacciones paracrinas entre el oocito y las células de la granulosa circundantes son críticas para una correcta función celular y un adecuado desarrollo oocitario (Guigon et al., 2006).

De especial relevancia en el crecimiento del oocito son los procesos mediados por la interacción Kit-kit ligand (Driancourt et al., 2000), así como Kit ligand a través de la interacción con GDF9 y BMP15 (Hutt et al., 2006; Thomas et al., 2006; Miyoshi et al., 2006).

Mecanismos de interacción celular

Los procesos de interacción celular aseguran el mantenimiento de la arquitectura tisular y garantizan el correcto desarrollo funcional de los órganos. Dichos procesos incluyen las interacciones célula-célula y célula-MEC (matriz extracelular) y pueden tener lugar vía estructuras de gran complejidad (cell junction) o a través de simples contactos celulares (non cell junction). Las cell junctions incluyen especializaciones de la membrana celular del tipo de las tight junctions, adherens junctions, gap junctions, desmosomas, hemidesmosomas o contactos focales; mientras que las segundas son meros contactos célula-célula y célula-MEC de gran sencillez

estructural y dinamismo (Figura 2).

En los ovarios, y en particular en los folículos, se dan la mayor parte de los mecanismos de interacción celular mencionados. De todos ellos, las gap junctions (GJ) han sido descritas como

al., 2002; Wright et al., 2001). Está ampliamente admitido que las interacciones celulares que se producen en el propio folículo ovárico desempeñan un papel esencial para la correcta maduración oocitaria. Así pues, el complejo diálogo intercelular resul-

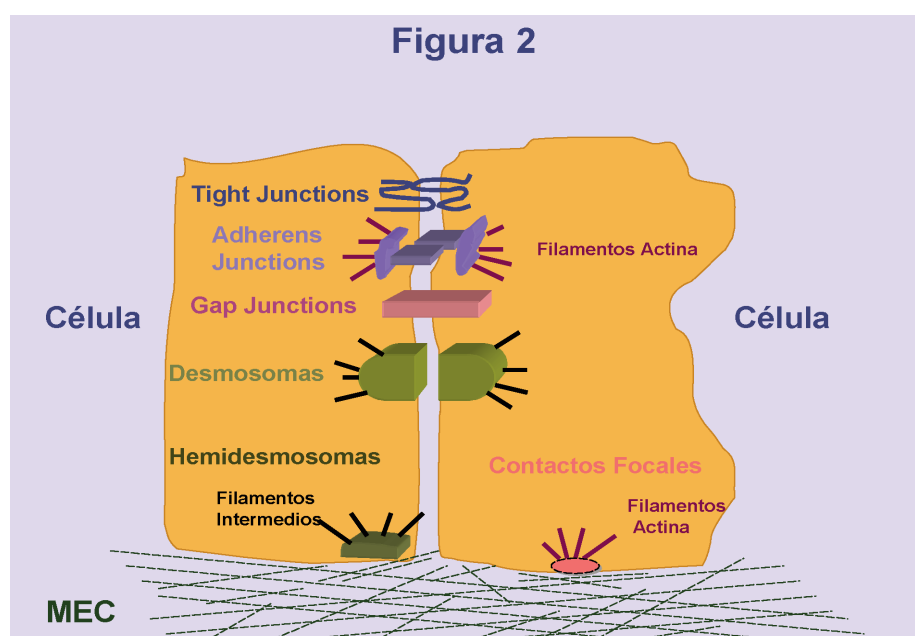


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de interacción celular. Las células pueden establecer procesos de adhesión con células contiguas (interacción célula-célula) o con las proteínas de la matriz extracelular (interacción célula-MEC). En ambos casos, la interacción puede tener lugar a través de estructuras complejas (cell junctions) o vía meros contactos celulares de escasa complejidad estructural (non cell junctions).

elementos clave en el proceso de la foliculogénesis. Las GJ son agrupaciones de canales intercelulares que permiten una comunicación citoplasmática directa entre células adyacentes (Evans et al., 2002). Estos canales están, a su vez, formados por subunidades de proteínas denominadas conexinas (Cxs); y permiten el paso de pequeñas moléculas -iones, metabolitos, segundos mensajeros- haciendo posible de este modo la sincronización del comportamiento celular. Estas estructuras permiten la coordinación entre las propias células de la granulosa, y de éstas con el oocito; de ahí la relevancia de las GJ en la maduración oocitaria (Kidder et

ta crucial para la regulación de este proceso. Además de las ya citadas Cxs, existen otras moléculas implicadas en estos procesos. Estas últimas pertenecen a distintas familias de moléculas de adhesión que incluyen la superfamilia de las Integrinas, la superfamilia de las Ig(s), la familia de las Selectinas, la familia de las Cadherinas, la familia de los Proteoglicanos y las Sialomucinas (Tabla 1; Figuras 3-6); y están formando parte de las complejas estructuras mencionadas o de simples contactos celulares, según los casos. Procesos de interacción célula-célula implicados en foliculogéne-

sis. Durante el proceso de foliculogénesis, las interacciones célula-célula mediadas a través de las GJ, en particular las GJ de conexina 43 (Cx43), desempeñan un papel fundamental (Tabla II).

La Cx43 es un miembro de la familia de las Cxs que se expresa mayoritariamente en el folículo ovárico y cuyo papel es clave en foliculogénesis. El estudio llevado a cabo con ratones knockout para Cx43 pone de manifiesto que la presencia de esta molécula resulta imprescindible para mantener la comunicación entre las células de la granulosa que rodean al oocito y sostener, por tanto, la proliferación de estas células y la maduración folicular; en ausencia de Cx43 los folículos se detienen en estadio preantral temprano y los oocitos resultan incompetentes (Juneja et al., 1999; Ackert et al., 2001).

Las GJ de Cx43 existen ya en folículos primordiales, la expresión de Cx43 se acumula coincidiendo con el crecimiento folicular, y dicha expresión está sujeta a modulación durante el ciclo ovárico a través de las hormonas FSH y LH: la primera estimula la síntesis de Cx43 y la amplificación de canales intercelulares funcionales, mientras que la segunda, en una respuesta inmediata, interrumpe la comunicación célula-célula por la fosforilación y cambio conformacional de la molécula de Cx43 que conduce al cierre de los canales de las GJ (Granot et al., 2002, Yogo et al., 2002; Yogo et al., 2006).

La hormona LH tiene, por tanto, un efecto inmediato que es seguido por una respuesta tardía que conduce a la eliminación de la proteína por estimulación de la reducción de los niveles de mRNA; y a la desaparición final de las GJ de Cx43 (Gittens et al., 2005). Algunos autores han propuesto además que el efecto de las hormonas FSH y LH está mediado por las hormonas esteroideas sintetizadas en el propio ovario, aunque se desconocen con exactitud los mecanismos implicados

Tabla I Familias de moléculas de adhesión

Superfamilia de las integrinas

Superfamilia de las Igs

Selectinas

Cadherinas

Proteoglicanos

Tabla I. Familias de moléculas implicadas en procesos de adhesión celular. Algunas de estas familias reciben la denominación de superfamilias. La mayoría de estas familias incluyen un número considerable de moléculas que se encuadran en cada familia por su similitud estructural y funcional.

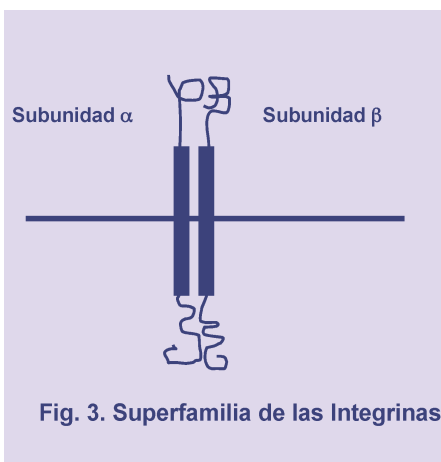


Fig. 3. Superfamilia de las Integrinas

Figura 3. Superfamilia de la Integrinas. Esta superfamilia está constituida por un número considerable de miembros con amplia distribución tisular e importantes implicaciones funcionales. Las integrinas, que están implicadas en interacciones célula-célula y célula-MEC, son glicoproteínas integrales de membrana que están formadas por una subunidad a y otra subunidad b. Cada subunidad contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Ambos dominios extracelulares participan en la unión al entorno extracelular, produciendo cambios en los dominios citoplasmáticos de las subunidades que, a su vez, alteran su interacción con el citoesqueleto y otras proteínas intracelulares. La señalización tiene lugar a través de la membrana en ambas direcciones, outside-in e inside-out que finalmente regulan la adhesión, el crecimiento y la migración celular.

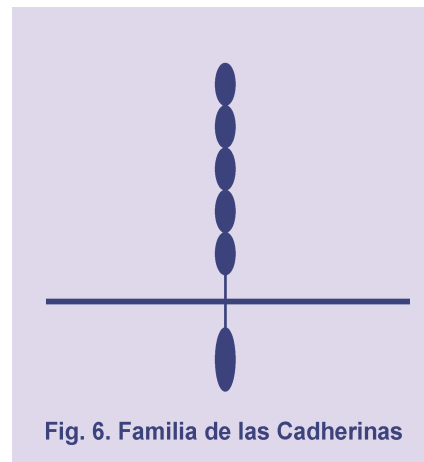


Fig. 6. Familia de las Cadherinas

Figura 6. Familia de las Cadherinas. Las cadherinas se engloban junto a las proto-cadherinas y otras moléculas adicionales implicadas en adhesión celular en una familia que recibe su nombre. Los miembros de esta familia (E, N, BR, P, R, M, VE, OB, KSP, T&H) son dependientes de iones de Ca^{2+} y juegan un papel importante en interacciones célula-célula garantizando así la integridad de tejidos y estructuras multicelulares. A nivel molecular, están constituidas por cinco dominios repetidos en su dominio extracelular, un segmento transmembrana, y una región citoplasmática que interacciona con moléculas de catenina que, a su vez, se unen al citoesqueleto de actina. Las cadherinas generalmente median interacciones célula-célula de carácter homotípico y actúan, simultáneamente, como receptor y ligando.

Tabla II Moléculas de interacción célula-célula implicadas en foliculogénesis

Superfamilia de la Igs (ICAM-1, VCAM-1, LFA-1)

Selectinas (L-Selectina)

Cadherinas (N-Cad, E-Cad)

Conexinas (Cx43, Cx37)

Tabla II. Moléculas de interacción célula-célula implicadas en foliculogénesis. La tabla muestra una recopilación de aquellas moléculas cuya expresión se ha descrito en ovario (ICAM-1, VCAM-1, LFA-1, L-Selectina, N-Cadherina), así como otras moléculas cuyo papel en foliculogénesis resulta clave. La Cad-E presenta un papel importante en foliculogénesis, y más aún la Cx43 y la Cx37 resultan imprescindibles.

en este proceso.

Además, se ha descrito la expresión de otros miembros de la familia de las Cx(s), entre ellos, Cx26, Cx30, Cx32, Cx37, Cx40 y Cx45 en tejido ovárico de diferentes especies de mamíferos (Goodenough et al., 1999; Teilmann et al., 2005; Simon et al., 2006). Aunque las células de la granulosa se comunican entre ellas a través de GJ de Cx43, éstas se comunican con el oocito a través de GJ de Cx37 (Gittens et al., 2005).

La Cx37 desempeña un papel esencial para el desarrollo folicular, la maduración del oocito y la ovulación; en ausencia de Cx37, los folículos no llegan a folículo antral y es causa de infertilidad en ratones (Simon et al., 2002) (Tabla II). La comunicación celular a través de las GJ de Cx37 garantiza el paso de nutrientes y segundos mensajeros al interior del oocito desde las células de la granulosa y viceversa. Está ampliamente admitido que la comunicación oocito-células de la granu-

losa es bidireccional, de manera que el oocito recibe información del exterior pero a su vez la información procedente del oocito condiciona la evolución de las células de la granulosa que lo rodean (Guigon et al., 2006).

Existen otras moléculas implicadas en contactos célula-célula que desempeñan un papel relevante en la arquitectura y el desarrollo folicular (Tabla II). Este es el caso de las moléculas de adhesión dependientes de calcio, las cadherinas, que regulan la formación de las cell junctions, así como el establecimiento de la polaridad celular (Schuldt et al., 2005).

La implicación de las cadherinas en la remodelación tisular sugiere una implicación inequívoca en la reorganización celular del ovario en su desarrollo postnatal. Así pues, cambios de expresión de las cadherinas N y E (Cad-N, Cad-E) se han descrito coincidiendo con el crecimiento ovárico y la foliculogénesis (Machell et al., 2000), así

como cambios en el perfil de distribución de otras cadherinas (Machell et al., 2003; Ziv et al., 2002).

La Cad-E está presente entre las células de la granulosa y forma parte de las estructuras tipo cell junctions que garantizan un estrecho contacto celular; y desempeña un papel importante en el estadio preantral tardío y antral (Machell et al., 2003). Además, el análisis de los ratones knockout para Cad-E demuestra el papel esencial que desempeña esta molécula en el desarrollo embrionario temprano puesto que ninguno de los embriones sin Cad-E llega a alcanzar el estadio de blastocisto (Larue et al., 1996).

Finalmente, otras moléculas implicadas en interacciones célula-célula, como por ejemplo ICAM-1, VCAM-1 y L-Selectina (Campbell et al., 1995) o incluso LFA-1 (Lu et al., 2002) también se han detectado en oocitos aunque su función exacta se desconoce hasta el momento (Tabla II).

Procesos de interacción célula-MEC implicados en foliculogénesis

Los procesos de interacción celular engloban, además de las interacciones célula-célula, las interacciones que las células establecen con proteínas de la matriz extracelular (MEC). La MEC está formada por un conjunto de macromoléculas como laminina, fibronectina, perlecan, nidogen y distintos tipos de colágeno, que participan en procesos biológicos como migración celular, proliferación, crecimiento y desarrollo. En el ovario, la MEC constituye la lámina folicular basal y está presente entre las células foliculares y en el fluido folicular, y juega un papel relevante en la función ovárica según demuestran los numerosos trabajos publicados en los últimos años (Clavero et al., 2004; Ahmed et al., 2005; Irving-Rodgers et al., 2005, 2006; Shozu et al., 2005; Russel et al., 2006; Curry et al., 2006; Berkholtz et al., 2006a,b).

En el ovario, los folículos contienen diferentes tipos celulares y compartimentos separados que cambian a lo largo del proceso de crecimiento y desarrollo folicular.

Aunque la cantidad relativa y la distribución de las proteínas de matriz dentro del folículo en desarrollo no se sabe con exactitud (Berkholtz et al., 2006a) parece claro que son capaces de promover o inhibir procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular que ocurren durante el desarrollo folicular.

Los componentes de la matriz extracelular varían en los distintos compartimentos foliculares, teniendo dichos componentes una implicación diferencial en los procesos de desarrollo folicular y atresia celular (Irving-Rodgers et al., 2006). Además, la composición de la matriz no sólo varía por los cambios en la síntesis de nuevos componentes, sino por la degradación proteolítica de las proteínas debida a la acción de enzimas como las metaloproteasas, activadores del plasminógeno y proteínas ADAMTS (Shozu et al., 2005; Curry et al., 2006).

En la actualidad se ha demostrado de forma inequívoca el papel de la MEC en la regulación de los procesos celulares que tienen lugar en el ovario (Berkholtz et al., 2006b), así como la activación transcripcional de algunos genes de MEC en la transición de folículos primordiales a folículos primarios, o incluso la inhibición de un número elevado de otros genes de MEC en el mismo estadio de desarrollo evolutivo (Yoon et al., 2006). Por tanto, la formación y el desarrollo, así como la ovulación y la regresión de los folículos se asocian a una considerable remodelación tisular, tal que los distintos constituyentes de la MEC -a través de sus receptores específicos de membrana- estarían directamente implicados en tales procesos (Ahmed et al., 2005; Irving-Rodgers et al., 2005, 2006; Shozu et al., 2005; Russel et al. 2006).

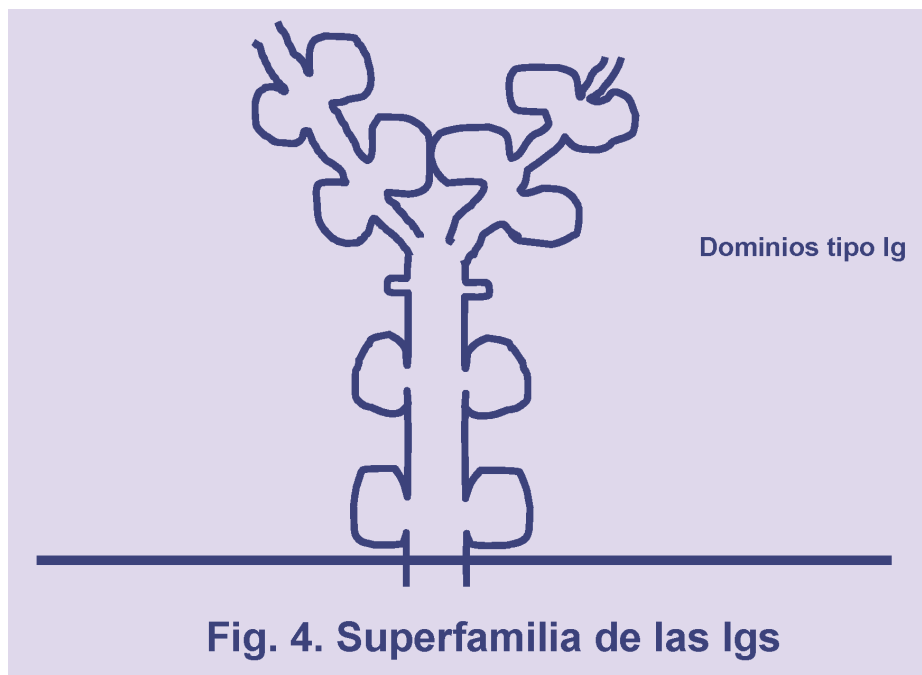


Fig. 4. Superfamilia de las Igs

Figura 4. Superfamilia de las Igs. Esta superfamilia contiene numerosos miembros que están implicados en adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1, LFA-1), así como otras moléculas relacionadas con transporte molecular, regulación de la expresión génica, migración celular y otros procesos biológicos. Sin embargo, pese a su diferente funcionalidad, todos los miembros de esta familia comparten una estructura molecular en dominios específicos de alta homología con las conocidas inmunoglobulinas (Igs), cuya estructura tipo está representada en esta figura. El grupo de moléculas de esta familia que están implicados en procesos de adhesión celular tienen un número variable de dichos dominios.

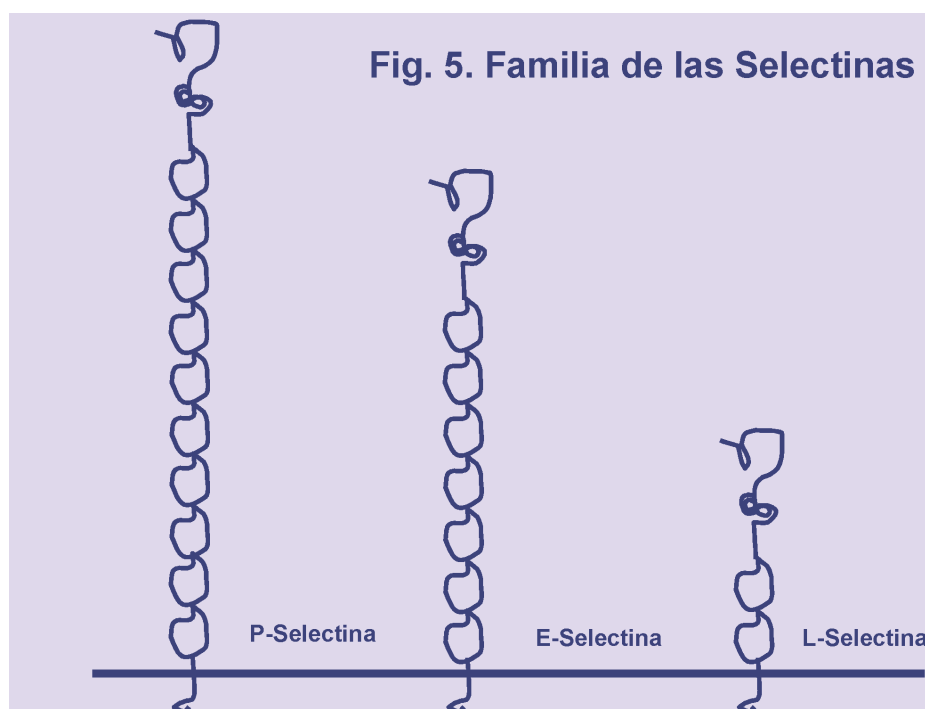


Fig. 5. Familia de las Selectinas

Figura 5. Familia de las Selectinas. Esta familia está constituida por tres miembros: P-Selectina (PAD-GEM), E-Selectina (ELAM-1) y L-Selectina. Todas ellas son glicoproteínas transmembrana de cadena única cuya región extracelular está formada por un dominio lectina en posición amino-terminal, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), y entre dos y nueve unidades repetidas estructuralmente homólogas a proteínas de unión al complemento. La expresión de estas moléculas mediadoras de adhesión celular a carbohidratos se asocia a procesos inflamatorios.

Las moléculas que se expresan en la superficie celular y actúan como receptores de las proteínas de MEC pertenecen, a su vez, a distintas familias de moléculas de adhesión (ver Tabla I). La familia más numerosa y más ampliamente descrita es la superfamilia de las integrinas (Figura 3), cuyos miembros pueden formar parte de estructuras complejas o participar en meros contactos celulares.

Las integrinas facilitan la adhesión de las células a la MEC y activan además los mecanismos de señalización que regulan la reestructuración del citoesqueleto, el comportamiento celular y la síntesis de proteínas. Diversos trabajos han demostrado la presencia de distintas subunidades α y β de las integrinas en el ovario (Burns et al., 2002), en oocitos (Pate et al., 2006) y en células de la granulosa (Clavero et al., 2004).

En concreto, la subunidad $\alpha 6$ de las integrinas se ha descrito en células de la granulosa de folículos preovulatorios (Nakamura et al., 1997) y desempeña un papel clave en foliculogénesis (Honda et al., 1995; Fujiwara et al., 1996) (Tabla III). Asimismo, la integrina $\alpha 6 \beta 1$ asociada a CD9 está implicada en la regulación de la posterior luteinización de estas células a través de su ligando de MEC, la laminina (Takao et al., 1999).

A su vez, miembros de otras familias de moléculas de adhesión como CD44 (HCAM), receptor del ácido hialurónico y miembro de la familia de los proteoglicanos, está implicado tanto en procesos de interacción célula-célula como célula-MEC, y también se expresa en oocitos (Lu et al., 2002) así como en complejos cúmulo-oocito (Assou et al., 2006; Sato et al., 2005) (Tabla III).

En conclusión, la foliculogénesis es un proceso de una extraordinaria complejidad, que por tanto está sujeto a una estricta regulación y en el que las interacciones celulares desempeñan un papel fundamental. Numerosos estudios desarrollados

en animales experimentales demuestran que el estrecho diálogo intercelular garantiza la correcta consecución de la maduración oocitaria.

Ackert CL, Gittens JE, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ova-

Tabla III Moléculas de interacción célula-MEC implicadas en foliculogénesis

Superfamilia de las integrinas ($\alpha 6 \beta 1$)

Proteoglicanos (CD44)

Tabla III: Moléculas de interacción célula-MEC implicadas en foliculogénesis. Esta tabla incluye sólo dos moléculas cuyo papel es destacado en foliculogénesis; se trata de la integrina $\alpha 6 \beta 1$ y del proteoglicano CD44. Ambas moléculas se expresan en la superficie celular y actúan como receptores de ligandos de MEC. La interacción receptor-ligando específica activa una cascada de señalización intracelular que conduce al efecto biológico final de dicha interacción.

En este artículo se hace una revisión de las numerosas moléculas implicadas tanto en contactos célula-célula como célula-MEC, así como las diferentes estructuras de las que forman parte, que gobiernan por mecanismos diversos el proceso de la foliculogénesis.

En conclusión, una sincronizada interacción bidireccional entre las células somáticas y las células germinales asegura el proceso normal de la foliculogénesis y su adecuada duración.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado en su totalidad de forma privada por la gerencia de la Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología, FivMadrid.

BIBLIOGRAFÍA

rian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol* 2001; 233(2):258-70.

Adashi E, Leung PCK. *The Ovary: Comprehensive Endocrinology*. Raven New York. 1993.

Ahmed N, Riley C, Rice G, Quinn M. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22(5):391-402.

Assou S, Anahory T, Pantescio V, Le Corroux T, Pellestor F, Lein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. Cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Human Reprod* 2006; 21(7):1705-1719.

Berkholtz CB, Lai BE, Woodruff TK, Shea LD. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen,

- type IV collagen, fibronectin and laminin in mouse folliculogenesis. *Histochem Cell Biol* 2006a; 126(59):583-92.
- Berkholtz CB, Shea LD, Woodruff TK. Extracellular matrix functions in follicle maturation. *Semin Reprod Med* 2006b; 24(4):262-9.
- Burns KH, Owens GE, Fernández JM, Nilson JH, Matzuk MM. Characterization of integrin expression in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2002; 67(3):743-51.
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reprod* 1995; 10(6):1571-8.
- Clavero A, Castilla JA, Martínez I, Mendoza N, Fontes J, Maldonado V. Expression of integrin fraction and adhesion molecules on human granulosa cells and its relation with oocyte maturity and follicular steroidogenesis. *J Assist Repro Genet* 2004; 21(6):187-95.
- Curry TE, Smith MF. Impact of extracellular matrix remodelling on ovulation and the follicle-luteal transition. *Semin Reprod Med* 2006; 24(4):228-41.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smits J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reproduction* 2000; 5:143-52.
- Evans WH, Martin PEM. Lighting up gap junction channels in a flash. *BioEssays* 2002; 24:876-80.
- Fortune JE, Cushman RA, Kito WS. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:53-60.
- Fujiwara H, Maeda M, Honda T, Yamada S, Ueda M, Kanzaki H, Suginami H, Mori T. Granulosa cells express integrin alpha 6: possible involvement of integrin alpha 6 in folliculogenesis. *Horm Res* 1996; 46(1):24-30.
- Gittens JE, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci* 2005a; 118(1):5071-8.
- Gittens JE, Kidder GM. Differential contributions of connexin 37 and connexin 43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J Cell Sci* 2005b; 118(21):5071-8.
- Goodenough DA, Simon AM, Paul DL. Gap Junctional intercellular communication in the mouse ovarian follicle. *Novartis Found Symp* 1999; 219:226-35.
- Granot I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin 43: regulation by gonadotropins. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13(7):310-13.
- Guigon CJ, Magre S. Contribution of Germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* . 2006; 74:450-58.
- Hernández ER, Hurwitz A, Botero L, Ricciarelli E, Werner H, Roberts CT Jr, LeRoith D, Adashi EY. Insulin-like growth factor receptor gene expression in the rat ovary: divergent regulation of distinct receptor species. *Mol Endocrinol* 1991; 5(12):1799-805.
- Hernández ER, Hurwitz A, Vera A, Pellicer A, Adashi EY, LeRoith D, Roberts CT Jr. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74(2):419-25.
- Honda T, Fujiwara H, Ueda M, Maeda M, Mori T. Integrin alpha 6 is a differentiation antigen of human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(10):2899-905.
- Hutt KJ, Mc Laughlin EA, Holland MK. Kit/Kit ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod* 2006; 75(3):421-3.
- Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. *Cell Tissue Res* 2005; 322(1):89-98.
- Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Semin Reprod Med* 2006; 24(4):195-203.
- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biol Reprod* 1999; 60(5):1263-70.
- Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 2002; 123(5):613-20.
- Kocabas AM, Crosby J, Ross PJ, Out HH, Beyhan Z, Can H, Tam WL, Rosa GJ, Halgren RG, Lim B, Fernández E, Cibelli JB. The transcriptome of human oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(38):14027-32.
- Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 91(17):8263-7.
- Lei L, Zhang H, Jin S, Wang F, Fu M, Wang H, Xia G. Stage-specific

- germ-somatic cell interaction directs the primordial folliculogenesis in mouse fetal ovaries. *J Cell Physiol* 2006; 208(3):640-7.
- Lu DP, Tian L, O'Neill C, King NJ. Regulation of cellular adhesion molecule expression in murine oocytes, peri-implantation and post-implantation embryos. *Cell Res* 2002; 12(5-6):373-83.
- Machell NH, Blaschuk OW, Farookhi R. Developmental expression and distribution of N- and E-cadherin in rat ovary. *Biol Reprod.* 2000; 63(3):797-804.
- Machell NH, Farookhi R. E- and N-cadherin expression and distribution during luteinization in the rat ovary. *Reproduction* 2003; 125(6):791-800.
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular Communication in the Mammalian Ovary: Oocytes Carry the conversation. *Science* 2002; 296:2178-180.
- Miyoshi T, Otsuka F, Suzufki J; Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H. Mutual Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Signaling and Bone Morphogenetic Protein System in Human Granulosa Cells. *Biol Reprod* 2006; 74(6):1073-82.
- Nakamura K, Fujiwara H, Higuchi T, Honda T, Nakayama T, Kataoka N, Fujita K, Ueda M, Maeda M, Mori T. Integrin alpha6 is involved in follicular growth in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235(3):524-8.
- Pangas SA, Woodruff TK. Activin signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(8):309-14.
- Pate BJ, White KL, Winger QA, Rickords LF, Aston KI, Sessions BR, Li GP, Campbell KD, Weimer B, Bunch TD. Specific integrin subunits in bovine oocytes, including novel sequences for alpha 6 and beta 3 subunits. *Mol Reprod Dev* 2006; 12.
- Peramo B, Ricciarelli E, Hernández ER. Regulación intraovárica de la foli-culogénesis. Factores de crecimiento. *Reproducción Humana. McGraw-Hill. Interamericana*; 2002.
- Russel DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med* 2006; 24(4):217-27.
- Sato E, Yokoo M. Morphological and biochemical dynamics of porcine cumulus-oocyte complexes: role of cumulus expansion in oocyte maturation. *Ital J Anat Embryol* 2005; 110(2):205-17.
- Schuldt A. Cadherins reach out. *Nat Cell Biol* 2005; 7(12):1066.
- Shimada M, Terada T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(7):612-8.
- Shozu M, Minami N, Yokoyama H, Inoue M, Karihara H, Matsushima K, Kuno K. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol* 2005; 35(2):343-55.
- Simon AM, Mc Whorter AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin 37 and connexin 40. *Dev Biol* 2002; 251(2):206-20.
- Simon AM, Chen H, Jackson CL. Cx37 and Cx43 localize in zona pellucida in mouse ovarian follicles. *Cell Commun Adhes* 2006; 13(1-2):61-77.
- Takao Y, Fujiwara H, Yamada S, Hirano T, Maeda M, Fujii S, Ueda M. CD9 is expressed on the cell surface of human granulosa cells and associated with alpha6beta1. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(4):303-10.
- Teilmann SC. Differential expression and localization of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234(1-2):27-35.
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 12(4):19.
- Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE, Hardy K. Stage-specific and differential expression in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction* 2001; 121(1):77-88.
- Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida N, Takeya T. Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Lett* 2002; 531(2):132-6.
- Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida-Kitagawa N, Sasada H, Sato E, Takeya T. PKA implicated in the phosphorylation of Cx43 induced by stimulation with FSH in rat granulosa cells. *J Reprod Dev* 2006;

52(3):321-8.

Reprod Dev 2002; 62(4):547-56.

Yoon S, Kim K, Chung H, Choi D, Lee W, Cha K, Lee K. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. *Fert Ster* 2006; 85(1):193-203.

Ziv S, Rufas O, Shalgi R. Cadherins expression during gamete maturation and fertilization in the rat. *Mol*

**REPROGENETICS**

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

NUESTRA EXPERIENCIA EN DGP: 10.050 CICLOS (DIC 2006)

REALIZAMOS

Test de aneuploidías, reorganizaciones cromosómicas y
enfermedades monogénicas

OFRECEMOS

Programación inmediata - Alta experiencia - Continua innovación tecnológica

REPROGENETICS SPAIN
TEL +34 935 814 455 - FAX +34 935 814 466

www.reprogeneticsspain.com
pgdteam@reprogeneticsspain.com

CONTACTO USA: pgdteam@reprogenetics.com
www.reprogenetics.com

CONVOCATORIAS ASEBIR, 07

Estimados compañeros / as:

Se comunica que a partir del **1 de abril de 2007**, quedará abierto el plazo de presentación de candidaturas para:

6 CARGOS DE LA JUNTA DIRECTIVA.

Según los estatutos de ASEBIR (Capítulo III, art.16) y cumplido el plazo de la mitad de los cargos de la Junta Directiva, convocamos a todos los socios interesados en pertenecer al órgano directivo a que propongan su candidatura para las próximas elecciones a esta Junta. Para lo cual deberán presentar su petición apoyada por un número mínimo de cinco socios a la secretaría de ASEBIR, a la atención de la Secretaria de la Junta.

SEDE DEL V CONGRESO ASEBIR 2009.

También se comunica que queda abierto el plazo para la presentación de candidaturas para la organización del próximo congreso de ASEBIR a celebrar en el año 2009. Los interesados deberán mandar a la secretaría de ASEBIR, a la atención de la Vocalía de Congresos, la siguiente documentación:

- Datos de la persona responsable de la solicitud (incluido Centro de trabajo) y comité organizador local. Importante la inclusión de una memoria con la trayectoria de la actividad en Biología de la Reproducción del comité organizador solicitante.
- Ciudad que representa la candidatura, especificando comunicaciones y disponibilidad de alojamiento.
- Sede del Congreso (especificar características como ubicación, espacio disponible, etc.).

El plazo para la presentación de solicitudes se prolongará **HASTA EL DÍA 1 DE OCTUBRE DE 2007** y las elecciones tanto de los cargos directivos como la sede del próximo Congreso, se realizará en la próxima Asamblea General a celebrar el día 23 de Noviembre del 2007 dentro del marco del VI Congreso ASEBIR en Bilbao.

La Junta Directiva de ASEBIR

II CUADERNO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA. PUBLICACIÓN Y FE DE ERRATAS

II Cuaderno de Embriología Clínica. Publicación y fe de erratas

Desde la Junta Directiva de ASEBIR tenemos la inmensa satisfacción de comunicar la publicación del 2º volumen de la colección Cuadernos de Embriología Clínica.

En esta ocasión se analizan *los criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*, fruto del duro trabajo de un amplio grupo de profesionales expertos. Desgraciadamente un error durante el proceso de corrección y maquetación impidió que la lista de autores se publicase completa, por lo que a continuación volvemos a publicar dicha relación:

Coordinadores: Manuel Ardoy y Gloria Calderón. **Ponentes:** Jorge Cuadros, Raquel Herrero, María José Figueroa, Juan Manuel Moreno, Águeda Ortiz, Fernando Prados, Luz Rodríguez, Josep Santaló, María José de los Santos, Jorge Ten y M. José Torelló.

Finalmente anunciamos que este segundo volumen también quedará “colgado” en la página web www.asebir.com en su versión definitiva. Lamentamos las molestias ocasionadas y pedimos disculpas.

AGENDA

II Workshop de Biopsia y Fijación de Blastómeros
3 a 7 de Septiembre de 2007. Madrid, España
<http://www.centromedicinaembrionaria.com>

In-Vitro fertilization and Embryo Co-Culture.
Agosto 2007. Chennai, India
<http://groups-beta.google.com/group/invitrobaby>

5th World Congress on Ovulation Induction
13 a 15 de Septiembre de 2007. Roma, Italia
<http://www.ovulationinduction.org/>

2nd International IVI congress
19 a 21 de Septiembre de 2007. Barcelona, España
<http://www.congresoivi.com/barcelona/>

Andrology Symposium
20 de Septiembre de 2007. Barcelona, España
<http://www.congresoivi.com/barcelona/>

3rd Course on Molecular Basis and Translational Studies in Reproductive Medicine
ESHRE campus
21 a 22 de Septiembre de 2007. Utrecht, Holanda
<http://www.eshre.com/>

Polycystic Ovary Syndrome –A condition of our time
Joint RCOG / ESHRE conference
15 a 16 de Noviembre de 2007. Londres, Gran Bretaña
<http://www.eshre.com/>

IV Congreso ASEBIR
21 a 23 de Noviembre de 2007. Bilbao, España
<http://www.asebir.com/>

13th World Congress of Gynecological Endocrinology
28 de Febrero a 2 de Marzo de 2007. Florencia, Italia
<http://www.gynecologicalendocrinology.org/>

Boletín de Inscripción

DATOS PERSONALES

Don/Doña:.....
con Domicilio en C/..... CP:.....
Ciudad: Teléfono:Teléfono Móvil:.....
E-mail:.....
Formación Básica (Médico, Biólogo, Farmacéutico, etc.):Grado Académico (Licenciado, Doctor, Especialista en..., etc.).....

CENTRO DE TRABAJO

Domicilio profesional C/ CP:
Centro de Trabajo:Departamento:.....
Ciudad: Teléfono:..... Fax:.....
E-mail:.....

DESEA PERTENECER COMO MIEMBRO NUMERARIO A LA ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, ASEBIR

DATOS BANCARIOS

BANCO/CAJA..... AGENCIA.....
Nº CUENTA

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

 PROVINCIA.....
Desea recibir la correspondencia en: Dirección Particular ☐ Dirección de Trabajo ☐
FIRMA FECHA

ENVIAR A: **Secretaría ASEBIR** C/ Cronos Nº 20 Bloque 4, Planta 1ª, Nº 6, 28037 MADRID.

HOJA DE ORDEN DE PAGO BANCARIO (EJEMPLAR PARA EL BANCO)

Sr. Director de la Agencia Nº:.....Banco/caja.....
C/ Provincia.....

RUEGO A USTED SE SIRVA CARGAR EN

Nº CUENTA.....

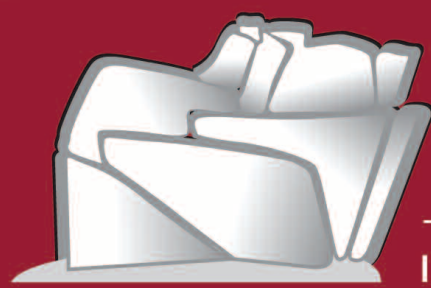
Los recibos que le presente al cobro la ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

FIRMA

FECHA

IV CONGRESO ASEBIR

21 AL 23 DE NOVIEMBRE DE 2007
BILBAO. PALACIO EUSKALDUNA



ASEBIR

IV CONGRESO

BILBAO 2007

**ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO
DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**