

REVISTA

ASEBIR

Junio 2008 Vol.14 · Nº1



ACTUALIDAD

A propósito de los cambios legislativos en Europa y España

ARTICULOS

Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos

Incidencia de multinucleación en FIV-ICSI

DEBATES

Criterios de valoración morfológica ASEBIR. Nuestra experiencia

FORMACIÓN CONTINUADA

Los glucocorticoides y la reproducción femenina

NOTICIAS

AGENDA

BOLETÍN DE INSCRIPCIÓN



IrvineScientific: VIT-KIT FREEZE / VIT-KIT THAW

Un mismo kit para la VITRIFICACIÓN de oocitos, embriones y blastocitos

PROCESO DE VITRIFICACION:



Solución de Equilibrio

Solución de Vitrificación

Embriones desvitrificados: división en día +4

PACIENTE 1



PACIENTE 2



** Imágenes cedidas por CREA (Valencia)



PROCESO	MEDIOS	MEDIOS CON PROTEINA	CRIOPRESERVACIÓN
Recuperación de oocitos	mHTF		Vit-kit Freeze / Vit-kit Thaw
Preparación de semen	mHTF	Sperm Washing Medium Isolate	Freezing M.-Test Yolk Buffer Refrigeration M.-Test Yolk Buffer
Preincubación de gametos	HTF P-1 / ECM	- Complete P-1 / Complete ECM	
Fertilización, y cultivo D1-D3	HTF P-1 / ECM SSM	- Complete P-1 / Complete ECM -	Vit-kit Freeze / Vit-kit Thaw Embryo Freeze / Embryo thaw
Cultivo D3-D6	MBM SSM	Complete MBM -	Vit-kit Freeze / Vit-kit Thaw Blastocyst Freeze / Blastocyst Thaw
ICSI	mHTF	PVP	
PGD	Tyrodé's	Embryo Biopsy Medium	

SSM: SINGLE STEP MEDIUM

IZASA, S.A.
C/ Aragó 90
Barcelona 080015

Consultas: irvine@izasa.es
DAC: 902.20.30.70

ASEBIR

SUMARIO

SUMARIO

Pág.

EDITORIAL 1

Mark Grossmann i Camps y M. Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta.

ACTUALIDAD 4

A propósito de los cambios legislativos en Europa y España.
Mark Grossmann i Camps y M. Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta.

ARTÍCULOS 6

Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos.
José Luis Cortés*, Gertrudis Ligeró, Laura Sánchez, Ana Nieto, Clara Bueno, Rosa Montes, Pablo Menéndez.

Incidencia de multinucleación en FIV-ICSI.
Brossa M., Blanch X., Antich M.

DEBATE 24

Criterios de valoración morfológica ASEBIR. Nuestra experiencia
Mariona Hugas, Maria Fernández, Joan Sarquella.

Criterios de valoración morfológica de embriones ASEBIR.
Pepi Ferrando Conceptum. Institut de Fertilitat i Reproducció Humana. Reus.

Evaluación de los criterios de valoración morfológicos de ovocitos, preembriones tempranos y blastocistos humanos propuestos por ASEBIR

José Luis Cortés, Pablo Menéndez Banco Andaluz de Células Madre. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Campus de la Salud.Granada

¿Con cuál nos quedamos? Marta Brossa, Marta Antich, Xènia Blanch. Laboratorio Fertilab. Barcelona.

¿Sería conveniente generalizar la evaluación morfológica embrionaria de "ASEBIR"?

Miren Mandiola. Hospital Quirón Donostia – Quirón Bilbao.

FORMACIÓN CONTINUADA 29

Los glucocorticoides y la reproducción femenina
Raquel González, Montserrat Gomendio y Eduardo R. S. Roldan.

NOTICIAS 38

Nueva Junta Directiva de Asebir

AGENDA 41

BOLETÍN DE INSCRIPCIÓN 26

Junio 2008 Vol. 14 • Nº1

EDITA

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

JUNTA DIRECTIVA

Presidente: Mark Grossmann i Camps.

Vicepresidenta: M^a Victoria Hurtado de Mendoza.

Secretaría: Nieves Cremades Fernández

Tesorero: Manuel Ardoy Vilches

Vocalía de Docencia y Formación: Jorge Martín Cuadros Fernández, Montserrat Boada Palá.

Vocalía del Sitio Web: Jorge Ten Morro, Fernando Marina Rugero.

Vocalía de Publicaciones: María Bonada Sanjaume, Antonio Urries López.

Vocalía de Congresos: M^a José de los Santos Molina, Begoña Arán Corbella, Nieves Cremades Fernández.

Vocalía de Relaciones Públicas: Fernando Marina Rugero, Jorge Ten Morro.

COORDINACIÓN

María Bonada Sanjaume,
Antonio Urries López.

PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

Secretaría ASEBIR

C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º, 6ª

28037 Madrid - Tfno: 91 367 89 94

www.asebir.com - asebir@asebir.com

DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

GÓBALO

Gráfica · Web · Multimedia · Consultoría

C/ Nogal 1, 1º Pta.31

28250 · Torrelozanes · Madrid

Tfno - Fax.: 91 859 57 22

www.gobalo.es · info@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

Soporte válido: 78-R-CM

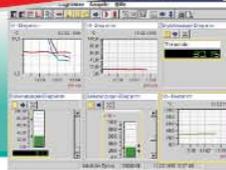
Instrumentación para FECUNDACIÓN IN VITRO

Incubadores de CO₂:

- ✓ 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

Heracell 150/240

Data Control opcional



Cabinas de flujo laminar para FIV:

- ✓ 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

Sterile SS / Al

Cabina con preparación para FECUNDACIÓN IN VITRO



Centrífugas:

- ✓ 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

Multifuge 1

Centrífuga Multifuge I



Autoclaves:

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

Systemc

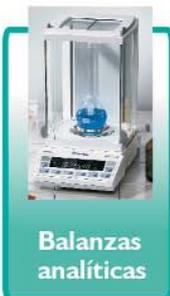
Autoclaves



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

Como bien sabéis, la revista de ASEBIR tiene una periodicidad semestral y para cuando se publique este número tan sólo habrán transcurrido escasos días desde la celebración de la Asamblea Ordinaria: muy poco tiempo como para tener novedades respecto a lo que se trató en la Asamblea. Aún así, queremos utilizar el espacio de Editorial como la página oficial de la Asociación, dónde exponer nuestras intenciones y nuestros temores, nuestras alegrías y nuestras penas.

Como bien sabéis, en el pasado congreso de Bilbao se produjo el relevo natural en la Junta Directiva después de las elecciones. Debido al cambio de estatutos esta Junta tiene una vida muy corta (dos años) y ya hace seis meses que presidimos nuestra asociación, que ahora ya tiene casi 550 miembros. Pero lo más destacable de ASEBIR es la red que formamos, ya que a través de los socios y las socias de ASEBIR estamos presentes en casi todos los centros de reproducción humana asistida españoles y también en casi todos los centros de investigación y docencia en reproducción asistida. Éste es un activo privilegiado que debemos mimar, y para dar una información ágil usaremos más y más las facilidades que la tecnología digital (vía boletín informativo) nos permita, de manera que os pedimos que mantengáis actualizadas vuestras direcciones de correo electrónico. En esta línea renovaremos completamente la página web (aspecto y contenidos) para que no sólo nos sea útil a nosotros, los "asebires", sino que sea una referencia también para el público en general.

Aunque los medios digitales ganen presencia debido a la inmediatez que proporcionan, mantendremos la publicación semestral de la revista así como la edición de los Cuadernos de Embriología. La revista, como bien sabéis, es de todos y depende de nuestras aportaciones tanto en artículos como en opiniones para la sección de "debates". Por favor hagamos un esfuerzo y consideremos qué trabajos podemos enviar a la revista.

Respecto a los Cuadernos, que están impulsados por la Junta Directiva a través de las comisiones que los redactan y revisan, ya vamos a por el tercero y en breve tendremos publicados o expuestos en la web las actualizaciones de los dos primeros.

Siguiendo el trabajo ya desarrollado por las Juntas Directivas anteriores hemos culminado la reforma de los Estatutos de nuestra asociación para adaptarlos a las necesidades actuales. Asimismo, continuamos batallando por el reconocimiento de la especialidad en embriología clínica se ha revisado a fondo el programa de formación en embriología y mantenemos contactos con el Consejo de Colegios Oficiales de Biólogos para aunar esfuerzos frente a la Administración. No sabemos hasta dónde podremos llegar, pero hasta que no se nos hayan cerrado todas las puertas trabajaremos para obtener el reconocimiento que creemos merecer.

De hecho, en este tema de la especialidad como en muchos otros aspectos nosotros continuamos el esfuerzo y asumimos los logros de la anterior Junta Directiva presidida por Antonio González-Utor y Carmen Ochoa Marieta. Desde estas páginas queremos agradecerles una vez más la enorme labor realizada a lo largo de muchos años de incansable dedicación a ASEBIR. No hay espacio para describir sus aportaciones, pero sus éxitos hablan por sí solos y sabemos que continuamos contando con su valiosa experiencia ¡Muchas gracias!

Tradicionalmente nos hemos relacionado con las organizaciones y estamentos que nos son propios, como las organizaciones profesionales afines a través de la Federación de Asociaciones, como la Comisión Nacional de Reproducción Asistida o como ESHRE. Esta Junta ha puesto su empeño en potenciar la presencia de ASEBIR, queremos poner las bases para que ASEBIR tenga entidad propia en los medios de comunicación, que sea conocida entre las organizaciones de usuarios y colabore en las reuniones científicas locales. Para nosotros será importante redefinir qué actividades auspiciamos y cómo participar más, a través de los Grupos de Interés, en actividades científico-formativas más allá de nuestro congreso.

Evidentemente cada dos años tenemos un momento estelar con la celebración del congreso ASEBIR. El próximo congreso, como bien sabéis todos, se celebrará en Noviembre de 2009 en Valencia. Vale la pena que ya desde hoy reservemos un espacio en nuestras agendas para poder encontrarnos allí de nuevo.

Estos son los objetivos fijados para este corto periodo de Junta Directiva. Por nuestra parte y por la de todos los miembros de Junta pondremos muchas ganas, mucho tiempo y muchas energías para trabajar en pro de ASEBIR.

Mark Grossmann i Camps | Presidente



M. Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta | Vice-presidenta



A PROPÓSITO DE LOS CAMBIOS LEGISLATIVOS EN EUROPA Y ESPAÑA

En esta ocasión, más que hacer una puesta al día de un tema concreto, hemos considerado oportuno comentar diferentes aspectos que creemos destacados y la participación de ASEBIR en dichos eventos.

DIRECTIVA DE LA UNIÓN EUROPEA (UE)

La Directiva Europea sobre Tejidos y Células (EC/2004/23) cubre la donación de todos los tejidos y células realizados en el ámbito de la UE, con la excepción de la sangre y hemoderivados. Por tanto, los gametos, los embriones y las técnicas de reproducción humana asistida están afectados por esta directiva.

Contrariamente a lo que inicialmente se pueda pensar al ver un documento tan largo, hay puntos muy positivos tanto en el control de calidad como en la identificación de riesgos porque lo que esta directiva pretende no es tanto aumentar el rendimiento de las técnicas sino aumentar la seguridad en la manipulación de tejidos y células, minimizar el riesgo de la transmisión de enfermedades infecciosas y prevenir la confusión en la identificación de gametos y embriones (para más información léanse los comentarios de A. Veiga y JA. García Velasco en esta misma sección en Junio de 2006 o bien el documento ESHRE position paper on the EU Tissues and Cells Directive EC/ 2004/23 en la web de ESHRE). Esto requiere formar personal adecuado y certificado, documentar adecuadamente cada proceso, y formular los procedimientos estándar, con sus controles de calidad, en todas las unidades de Reproducción humana asistida.

La directiva europea prevé que, desde el mes de Mayo, se podrían realizar ya las inspecciones para comprobar que los centros de Reproducción Humana Asistida se han adaptado a esta normativa.

Para ayudar en la implementación de esta directiva, se creó un consorcio entre ESHRE- HFEA y formado por 3 representantes de cada país miembro de la UE (un representante de embriología, uno de medicina, y otro de la administración).

Desgraciadamente, aunque España fue uno de los primeros países en hacer la transposición de la directiva

(Real Decreto 1301/2006) aún no ha designado un representante de la autoridad competente, de manera que mientras que otros países ya están incluso formando a los primeros auditores, en España aún no disponemos de una guía para la correcta interpretación de la directiva y su cumplimiento (para más información véase (<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=678>)).

Las sociedades científicas agrupadas en la FEDERACIÓN DE ASOCIACIONES PARA EL ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN (SEF, ASES, SEC y ASEBIR) hemos firmado una carta conjunta instando al Ministerio de Sanidad y Consumo a designar el representante español cuanto antes mejor, para que no nos quedemos descolgados de este importante proceso.

Pero mientras tanto todos los centros de Reproducción humana asistida deben dedicarse a la lectura atenta del Real Decreto 1301/2006 y adoptar las medidas que consideren oportunas para implementarlo.

CERTIFICACIÓN ESHRE EN EMBRIOLOGÍA

La primera fase de este ambicioso proyecto consistió en la certificación, por vía extraordinaria, de los profesionales jefes de laboratorio con formación y experiencia. Se recibieron más de 400 solicitudes (80 procedentes de España) de las que se aceptaron más de 335. Inicialmente se pensó en publicar inmediatamente el listado de profesionales acreditados, pero como aún queda algún expediente por resolver, el Comité Ejecutivo de ESHRE acordó no publicar la lista hasta después del congreso ESHRE de Barcelona (Julio 2008) cuando esta lista ya sea definitiva. Otro acuerdo del comité ejecutivo de ESHRE fue exigir ser miembro de ESHRE para conseguir la certificación en embriología. Este requisito se basa en la idea que el proceso de certificación es, hoy por hoy, voluntario: ESHRE lo organiza

como una iniciativa privada a la que uno puede unirse o no, y por tanto la restringe a sus afiliados.

La segunda fase del proceso de certificación, aún dentro del período extraordinario de puesta en marcha, cerró la recepción de candidaturas el 31 de Marzo pasado y tendrá su punto álgido en los exámenes previstos en Julio de 2008, durante el congreso de Barcelona. Con ellos culminará la primera quinta de certificación en Senior Clinical Embryologist.

A partir de Febrero de 2009 se abrirá la fase regular para obtener la certificación en Clinical Embryologist.

Sabemos que la puesta en marcha de este proceso ESHRE de certificación ha generado dudas, incluso enfados y que hubo retrasos en los plazos previstos (algunos de ellos relacionados con la gran demanda que superó las previsiones).

ASEBIR, que ha dado y sigue dando pleno apoyo a esta iniciativa ESHRE, lamenta y pide disculpas por los inconvenientes. Consideramos de gran relevancia para regularizar la situación de la embriología clínica tanto en España como en Europa que se lleve a buen puerto este proceso de certificación e insta a todos los estudiantes y profesionales de la embriología a que se inscriban.

ASEBIR EN LA COMISIÓN NACIONAL DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

El Real Decreto 906/2007 modificó la composición de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida y nos dio voz y voto. Además se establece, dentro de la Comisión Nacional, una Comisión Técnica Permanente compuesta por los representantes de la Sociedad Española de Fertilidad, de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, y de la Asociación Española de Genética Humana, y dos representantes de la Administración

General del Estado, para estudiar, analizar y elevar al Pleno propuesta de informe en los supuestos previstos en el artículo 4.12.

Aunque las elecciones generales legislativas españolas han supuesto la paralización de las actividades de este tipo de comisiones, se pudo celebrar una reunión plenaria en el mes de Noviembre y ya se han valorado dos proyectos de investigación y varias

solicitudes de autorización para tratamientos experimentales.

Estamos muy satisfechos de la inclusión de ASEBIR en la propia Comisión Nacional y más en la Comisión Técnica Permanente y recordamos a todos que la Ley 14/2006 contempla que la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida reciba consultas sobre la aplicación de las técnicas (artículo 20º-3 Los centros y

servicios sanitarios en los que se apliquen las técnicas de reproducción asistida podrán igualmente solicitar el informe de la Comisión Nacional sobre cuestiones relacionadas con dicha aplicación. En este caso, el informe deberá solicitarse a través de la autoridad sanitaria que haya autorizado la aplicación de las técnicas de reproducción asistida por el centro o servicio correspondiente).

Mark Grossmann i Camps
| Presidente |



M. Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
| Vice-presidenta |



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

MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.



MediCult España S.L.

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

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

www.medicult.com



MediCult

Innovation with Care

Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos propuestos por ASEBIR

Morphological Assessment of Human Oocytes, early Embryos and Blastocysts proposed by ASEBIR

José Luis Cortés*, Gertrudis Ligeró, Laura Sánchez, Ana Nieto, Clara Bueno, Rosa Montes, Pablo Menéndez. Banco Andaluz de Células Madre. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Campus de la Salud. Granada.
*Correspondencia: jose.l.cortes.sspa@juntadeandalucia.es

Aplicabilidad en preembriones criopreservados donados para investigación con células madre.
Applicability in cryopreserved embryos donated to stem cell research.

RESUMEN

ASEBIR ha publicado en sus Cuadernos de Embriología Clínica los Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Preembriones tempranos y Blastocistos Humanos, buscando poder consensuar los criterios de calidad entre todas las clínicas de reproducción asistida españolas. Sin embargo, estos criterios no sólo deben ser útiles para los embriólogos clínicos, sino que pueden servir a los embriólogos pertenecientes a centros de investigación como ayuda para facilitar la derivación de líneas celulares embrionarias humanas así como para estudios moleculares y genéticos básicos de embriología humana. El objetivo de este trabajo es mostrar si los criterios publicados por ASEBIR son extrapolables a preembriones congelados donados a investigación con células madre, utilizando para ello los preembriones autorizados para un proyecto de investigación del Banco Andaluz de Células Madre.

Palabras clave: Calidad blastocitaria, Calidad embrionaria, célula madre embrionaria humana, masa celular interna, preembrión congelado.

SUMMARY

ASEBIR proposed in its Clinical Embryology Notebooks the Morphological Assessment for Human Oocytes, early Embryos and Blastocysts, aiming at reaching an agreement on the quality criteria between all Spanish assisted reproduction clinics. Nevertheless, these proposed criteria not only will be useful to clinical embryologists, but can also be useful to embryologists moving into basic research to help facilitate the derivation of human embryonic stem cells and further basic molecular and genetic studies on human embryo development. The aim of this work is to discuss if the criteria published by ASEBIR are useful and can be extrapolated to cryopreserved embryos which are donated to stem cell research using the authorized embryos for an ethically and scientifically approved research project to be carried out at the Andalusian Stem Cell Bank.

Key words: Blastocyst quality, embryonic quality, human embryonic stem cell, inner cell mass, cryopreserved embryo

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre células madre constituyen en la actualidad uno de los campos con más expectativas de la biomedicina. Cuando en noviembre de 1998, el grupo estadounidense liderado por James Thomson publicó los datos sobre la derivación de una línea de células madre embrionarias humana (hESCs, siglas inglesas de human embryonic stem cells) a partir de un blastocisto en fase de preimplantación, se abrió una nueva puerta de esperanza para la curación de enfermedades hasta

ahora incurables (Thomson y cols., 1998). Estas células suponen una herramienta de enorme valor para el "screening" de nuevos fármacos, así como un modelo para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa embrionaria, o como fuente futura de células en medicina regenerativa (Menendez et al., 2006).

La legislación en España respecto al uso de preembriones humanos sobrantes de ciclos de fecundación "in vitro" (FIV) está actualmente regulada por la Ley

14/2006, sobre técnicas de reproducción asistida, por el Real Decreto 1301/2006, sobre células y tejidos humanos, y por la Ley 14/2007, sobre investigación biomédica. En nuestra interpretación de estas leyes, la pareja sometida a un ciclo FIV puede dar un destino final a aquellos preembriones sobrantes que se encuentren criopreservados en nitrógeno líquido, independientemente del tiempo de congelación, siempre bajo consentimiento informado de la pareja. Los diferentes destinos posibles que pueden darse a los preembriones sobrantes criopreservados son:

- > Su utilización por la propia mujer o cónyuge.
- > La donación con fines reproductivos.
- > La donación con fines de investigación.
- > El cese de su conservación sin otra utilización.

Respecto a la utilización de preembriones con fines de investigación, sólo se autorizará si se atiende a varios requisitos:

- > Posesión del consentimiento informado.
- > Que el preembrión no se haya desarrollado *in vitro* más allá de 14 días después de la fecundación.
- > Que la investigación se realice en centros autorizados.
- > Que la investigación se realice en base a un proyecto debidamente presentado y autorizado por las autoridades competentes
- > Que se especifiquen las posibles relaciones de interés entre centros.

Esta legislación deja a España en un término medio de permisividad, englobándola en el grupo de países donde está permitido investigar con preembriones sobrantes de ciclos de FIV para derivar hESC (Canadá, Holanda, Australia, Suecia), lejos del grupo de países donde está prohibido utilizar preembriones para investigación con hESC (Irlanda, Austria, Noruega), aunque un peldaño por debajo del grupo de países donde se pueden generar preembriones con fines únicos de investigación (Reino Unido, Bélgica, Israel, Singapur).

Para la evaluación de la calidad embrionaria de aquellos preembriones crioconservados que han sido donados a investigación, el Centro de Reproducción Asistida facilita al Banco Andaluz de Células Madre (BACM) toda la información referente a cada preembrión; desde la calidad que poseía previo a la congelación, el método de congelación utilizado, así como el tiempo que llevan los preembriones congelados, entre otros datos.

ASEBIR, dentro de la Colección de Cuadernos de Embriología Clínica, ha publicado los Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. Esta propuesta ha sido diseñada debido a la falta de consenso en este aspecto clave

de la embriología clínica y que conlleva problemas tan comunes como la imposibilidad de generar estudios multicéntricos con valoraciones de calidad embrionaria común, de interpretar informes clínicos de laboratorios ajenos, o de comparar datos bibliográficos.

Desde el BACM hemos querido sumarnos a esta propuesta, para ver si estos criterios de valoración morfológicos son extrapolables a los preembriones crioconservados que son donados a nuestro proyecto de investigación para derivación de hESC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder disponer de material biológico para nuestras investigaciones, el BACM ha realizado durante los años 2006 y 2007 una campaña de recuperación de preembriones sobrantes, tanto en hospitales públicos andaluces como en clínicas privadas (Cortes y cols., 2007). Estos preembriones han pasado los Comités necesarios (Comité de Investigación con Preembriones Humanos de Andalucía y la Comisión de Seguimiento y Control de la Donación del Instituto de Salud Carlos III), que han dado la autorización pertinente para su uso en investigación a nuestro proyecto de investigación.

A nivel de infraestructura y organización del espacio, disponemos de un completo laboratorio de embriología, dentro de salas GMP (siglas inglesas de Good Manufacturing Practice), con equipamiento y personal cualificado para realizar la manipulación de estos preembriones y su posterior derivación a hESCs (Cortes y cols., 2006a, b).

Para la configuración del laboratorio de embriología evaluamos las guías propuestas por distintas asociaciones de reproducción asistida, observando que el único enfoque fue el reproductivo, haciéndose necesaria una actualización de dichas guías, debido a la existencia de laboratorios de embriología que no se dedican a realizar técnicas de reproducción (Cortes y cols., 2006b).

Los Centros de Reproducción Asistida de donde proceden los preembriones donados a investigación han facilitado al

BACM toda la información referente a cada preembrión, desde la calidad que poseía previo a la congelación, el método de congelación utilizado, así como el tiempo que llevan los preembriones congelados, entre otros datos. Los preembriones fueron congelados en estadio de división temprana (Día +2/+3), y fueron clasificados cualitativamente por las Clínicas de Reproducción de origen siguiendo los sistemas de evaluación de la calidad embrionaria tradicionales (Calderón y cols., 2002). Para los preembriones que llegaron al estadio de blastocisto utilizamos como criterio de clasificación tradicional el propuesto por Gardner (Gardner y cols., 1998).

Según los criterios propuestos por ASEBIR, la valoración morfológica en estos estadios ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Sin embargo, aunque hay cierto consenso entre la definición de un preembrión de buena o mala calidad, no existe consenso entre laboratorios cuando se trata de valorar preembriones de calidades intermedias. El objetivo de ASEBIR ha sido poder consensuar los criterios de calidad, creando una nueva tabla de clasificación embrionaria, cuando se trata del estadio de oocitos, preembriones tempranos, o cuando se trata de blastocistos. Nosotros nos vamos a centrar en los dos últimos estadios.

La calidad embrionaria fue evaluada por un embriólogo del BACM inmediatamente después del proceso de descongelación, y en los días sucesivos hasta su evolución a blastocisto, aunque sólo mostramos en este trabajo la situación inicial postdescongelación (Tabla 1) y la calidad de aquellos preembriones que llegaron al estadio de blastocisto (Tabla 2).

Una vez descongelados los preembriones fueron lavados en medio G-MOPS (Vitrolife, Suecia) y colocados en medio de cultivo (G-1 y G-2 V.5 plus, Vitrolife, Suecia). A continuación se evaluó la calidad embrionaria en base a los criterios de evaluación tradicionales y también en base a los nuevos criterios ASEBIR, y además se compararon con la calidad embrionaria precongelación, según los datos facilitados por los

Tabla 1: Tabla de asignación de calidad preembrionaria según los diferentes criterios en función de las variables consideradas.

Preemb.	Día descong	Nº células	% fragmentación	Similitud de tamaño	Multinucleación	Citoplasma	Zona pelúcida	Calidad precong	Calidad postcong	Calidad ASEBR
1	D+3	4	>35%	No	No	Rugoso	Normal	4CII	4CIII	D
2	D+3	8	<35%	No	No	Rugoso	Normal	8CII	8CIII	C
3	D+2	1+1 lisada	>35%	-	No	Rugoso	Normal	2CII	1CIV	D
4	D+2	5	<35%	No	No	Rugoso	Normal	5CIII	5CIII	C
5	D+2	2	<10%	Igual	Si	Rugoso	Normal	2CII	2CII	D
6	D+2	2	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	2CI	2CI	B
7	D+2	2	<10%	No	No	No vacuolas	Normal	2CII	2CII	C
8	D+2	2	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	2CI	2CI	B
9	D+2	2	<10%	No	Si	No vacuolas	Normal	2CII	2CII	D
10	D+3	5	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	5CII	5CII	B
11	D+3	5	<26%	No	No	No vacuolas	Normal	5CIII	5CIII	C
12	D+3	4	<10%	Igual	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
13	D+3	4	No	Igual	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
14	D+3	4	No	Igual	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
15	D+3	2+2 lisadas	>35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	4CIII	2CIV	D
16	D+3	4	<10%	No	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
17	D+3	6	No	No	No	No vacuolas	Elíptica	6CII	6CII	C
18	D+3	4	No	Igual	No	Escasas vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
19	D+3	4	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	4CI	4CI	D
20	D+3	5+1 lisada	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	6CI	5CII	C
21	D+2	6	<10%	No	No	Escasas vacuolas	Normal	6CII	6CII	C
22	D+2	2	<35%	Igual	No	No vacuolas	Elíptica	2CII	2CII	C
23	D+3	1+1 lisada	>35%	No	No	No vacuolas	Normal	2CIII	1CIV	D
24	D+3	7+1 lisada	No	No	No	No vacuolas	Normal	8CI	7CII	A
25	D+3	3+1 lisada	<35%	No	No	No vacuolas	Normal	4CII	3CIII	D
26	D+3	4	<10%	Igual	No	No vacuolas	Elíptica	4CII	4CII	D
27	D+3	5	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	5CI	5CI	D
28	D+3	5+2 lisadas	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	7CII	5CIII	D
29	D+3	3+2 lisadas	>35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	5CIII	3CIV	D
30	D+3	4	<35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
31	D+3	Lisado	-	-	-	-	Normal	5CIII	-	-
32	D+3	1+2 lisadas	>35%	-	No	No vacuolas	Normal	3CIII	1CIV	D
33	D+2	Lisado	<35%	-	-	-	Normal	3CIII	-	-
34	D+2	Lisado	<35%	-	-	-	Normal	4CII	-	-
35	D+2	3+1 lisada	<35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	4CII	3CII	D
36	D+3	4+2 lisadas	<35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	6CII	4CIII	D
37	D+3	Lisado	-	-	-	-	Normal	6CII	-	-
38	D+3	4	<35%	No	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	D
39	D+3	5	<35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	5CI	5CII	D
40	D+3	1+2 lisadas	No	-	No	No vacuolas	Normal	3CII	1CIII	D
41	D+3	5+1 lisada	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	6CI	5CII	D
42	D+2	2	>26%	Igual	No	No vacuolas	Normal	2CII	2CII	B
43	D+2	2+1 lisada	<35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	3CII	2CIII	C
44	D+2	1+1 lisada	>35%	-	No	Escasas vacuolas	Elíptica	2CIII	1CIV	D
45	D+2	Lisado	<10%	-	-	-	Normal	3CIII	-	-
46	D+2	1+1 lisada	<35%	-	No	Escasas vacuolas	Normal	2CIII	1CIV	D
47	D+3	1+4 lisadas	>35%	-	No	No vacuolas	Normal	5CII	1CIV	D
48	D+3	4	<35%	Igual	No	No vacuolas	Normal	4CII	4CII	C
49	D+3	7	No	Igual	No	No vacuolas	Normal	7CI	7CI	A
50	D+3	6	No	No	No	No vacuolas	Normal	6CII	6CII	C
51	D+3	1+5 lisadas	<35%	-	No	No vacuolas	Normal	6CII	1CIV	D
52	D+3	1+3 lisadas	<35%	-	No	No vacuolas	Normal	4CII	1CIV	D

Centros de Reproducción de procedencia (Tabla 1).

Los 52 preembriones que hemos utilizado para este estudio fueron congelados mediante dos métodos distintos de criopreservación. Por una parte, se utilizó el protocolo de congelación denominado de congelación ultrarrápida (Trounson y cols., 1988), y que consiste en la inmersión directa de los preembriones,

incluidos en dimetil sulfóxido (DMSO), en nitrógeno líquido. Por otra parte se utilizó el protocolo de congelación lenta (Freeze-kit1, Vitrolife, Suecia), que consiste en el tratamiento de los preembriones con un crioprotector que ocupa el lugar del agua que hay en las células mediante procesos osmóticos, seguido de un programa de congelación llevado a cabo por un congelador programable (Nicol plus, Air Liquide, España).

El objetivo de nuestro proyecto de investigación es poder derivar hESC a partir de estos preembriones. Esta derivación consiste en el desarrollo de los preembriones hasta estadio de blastocisto, la liberación de la zona pelúcida mediante el uso de ácido Tyrode (Irvine Scientific, CA, USA), la posterior colocación del blastocisto desnudo sobre una superficie de células de soporte (feeders), y el posterior aislamiento mecánico de la masa celular

interna (MCI), donde se encuentran las hESCs.

RESULTADOS

Día de desarrollo embrionario de los preembriones utilizados y métodos de congelación/descongelación utilizados

Para realizar nuestros experimentos hemos utilizado 52 preembriones que fueron congelados en estadio de división temprana (D+2 y D+3). Diecisiete preembriones fueron congelados en Día +2 (32,7%), mientras que 35 fueron congelados en Día +3 (67,3%). En todos los casos se utilizó para descongelar el protocolo de descongelación complementario al utilizado para la congelación.

Cinco preembriones (Preembriones 1-5) fueron congelados por el método de congelación ultrarrápida (9,6%). Los preembriones restantes (Preembriones 6-52) fueron congelados por el método de congelación lenta (90,4%).

Calidad embrionaria de los preembriones pre- y post-descongelación siguiendo los diferentes criterios de clasificación.

Para poder derivar nuevas hESC, partimos de 9 preembriones que poseían antes de la congelación calidad I (17,3%), 32 preembriones que poseían

calidad II (61,5%) y 11 preembriones que poseían calidad III (21,2%). Tras el proceso de descongelación, nuestra evaluación con criterios tradicionales dio los siguientes resultados: 5 preembriones con calidad I (9,6%), 23 preembriones con calidad II (44,2%), 9 preembriones con calidad III (17,3%), 10 preembriones con calidad IV (19,3%), y tuvimos 5 preembriones que se lisaron por completo y que no pudieron ser evaluados (9,6%). Según los nuevos criterios propuestos por ASEBIR y tras la descongelación de los preembriones obtuvimos los siguientes resultados: 2 preembriones de categoría A (3,8%), 4 preembriones con categoría B (7,7%), 11 preembriones con categoría C (21,1%), y 30 preembriones con categoría D (57,8%) (Tabla 1). Queremos destacar que en 19 preembriones (36,5%) observamos la lisis de alguna blastómera que no comprometió la supervivencia de los preembriones, pero que se tuvo en cuenta a la hora de reclasificar su calidad.

Fase experimental de descongelación y establecimiento de hESCs: datos preliminares.

De los 52 preembriones descongelados, 12 preembriones llegaron al estadio de blastocisto (23,1%), siendo en todos los casos preembriones descongelados con el método de descongelación lenta y en día +3 de desarrollo. Estos blastocistos procedían de preembriones de categoría

A en dos ocasiones (16,7%), de preembriones de categoría C en 3 ocasiones (25,0%) y de preembriones de categoría D en 7 ocasiones (58,3%). En ninguna ocasión el blastocisto se originó a partir de un preembrion de categoría B.

Respecto a la calidad blastocitaria evaluada con los criterios de Gardner, obtuvimos 2 blastocistos con calidad 4AA (16,7%), 2 blastocistos con calidad 4BB (16,7%), 3 blastocistos con calidad 3BB (25,0%), 4 blastocistos con calidad 3CC (33,3%), y un blastocisto con calidad 2BB (8,3%). Atendiendo a la nueva clasificación de ASEBIR obtuvimos un solo blastocisto con categoría A (8,3%), un solo blastocisto con categoría C (8,3%), y 10 blastocistos con categoría D (83,4%). Ninguno de los blastocistos se evaluó con categoría B (Tabla 2).

Los 12 blastocistos fueron liberados de la zona pelúcida utilizando ácido Tyrode y puestos sobre "feeders" para proceder a la derivación de hESCs. En 7 de los blastocistos (58,3%) se pudo aislar la masa celular interna. En el momento de escribir este trabajo, pequeñas colonias con morfología similar a hESCs seguían en cultivo y desarrollo buscando el establecimiento de la línea celular, correspondiendo al preembrion número 24 y al preembrion número 27.

Tabla 2: Tabla de asignación de calidad del blastocisto según los diferentes criterios en función de las variables consideradas.

Preembrion / Calidad embrionaria ASEBIR	Organización en blastocisto	Zona pelúcida	MCI	Tamaño MCI	Trofoectodermo	Grado expansión	Calidad Gardner	Calidad ASEBIR	Aislamiento de MCI para derivación hESC
13 (D)	D+6	Afinada	Oval y compactada	3800 µm ² -1900 µm ²	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrion	4AA	C	Si
14 (D)	D+6		Oval y compactada	<1900 µm ²	Epitelio irregular		2BB	D	No
15 (D)	D+6	Afinada	Oval y compactada	<1900 µm ²	Epitelio irregular Células escasas		4BB	D	Si
17 (C)	D+5	Afinada	Oval y compactada	3800 µm ² -1900 µm ²	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrion	4AA	A	No
18 (D)	D+6	Afinada	Oval y compactada	<1900 µm ²	Epitelio irregular		4BB	D	No
24 (A)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular	El blastocelo ocupa todo el volumen del preembrion	4BB	D	Si
27 (D)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3BB	D	Si
28 (D)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3BB	D	No
30 (D)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	No
48 (C)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	Si
49 (A)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	Si
50 (C)	D+6			<1900 µm ²	Epitelio irregular		3CC	D	Si

DISCUSIÓN

En este estudio hemos intentado comparar la calidad embrionaria de los preembriones antes y después de la congelación, siguiendo los criterios tradicionales, con la clasificación que tendrían estos preembriones utilizando los nuevos criterios de ASEBIR, con el fin de observar si esta nueva clasificación es extrapolable a los criterios de calidad embrionaria que se deducen serían necesarios para derivar una línea de hESCs. Para poder realizar esta comparación hemos tenido que obviar y transformar algunos términos que sólo son aplicables al campo reproductivo:

- i) Derivación de hESCs en vez de capacidad de implantación
- ii) Día de descongelación en lugar de día de transferencia

Además, hemos observado que en los nuevos criterios de valoración de ASEBIR no se contempla información sobre los preembriones congelados, no atendándose por tanto a la posibilidad de que alguna blastómera resulte lisada durante el proceso de descongelación. Cuando este hecho ha ocurrido en nuestro laboratorio, lo hemos tenido en

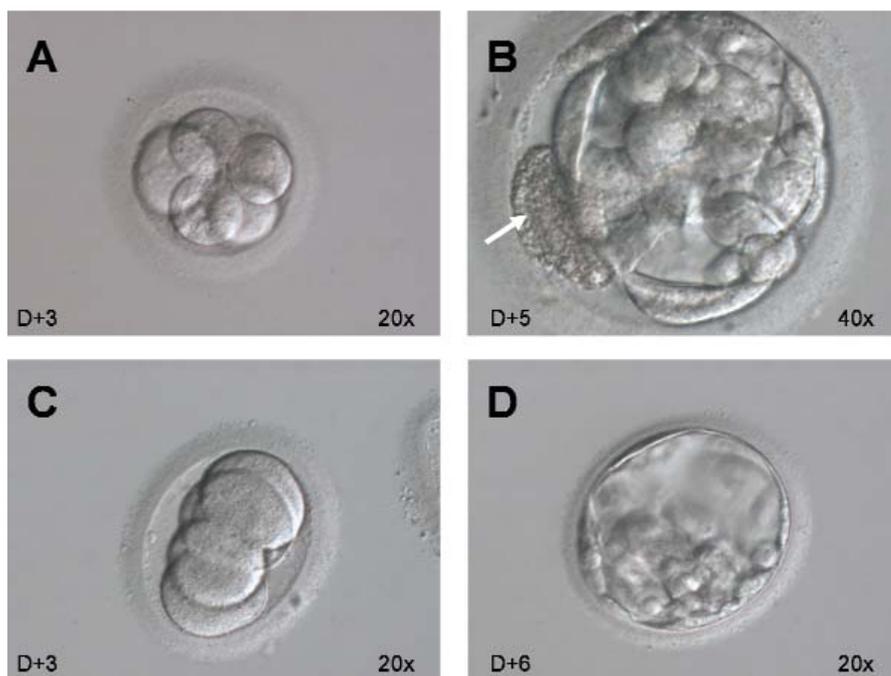
cuenta a la hora de determinar la calidad del preembrión (Tabla 1). De esta manera y según el sistema de graduación de ASEBIR, la categoría A sería para el preembrión de óptima calidad con máxima capacidad de derivar a hESCs, la categoría B de buena calidad con elevada capacidad de derivar a hESCs, la categoría C de calidad regular con una probabilidad de derivar a hESCs media/baja, y la categoría D para el preembrión de mala calidad con una probabilidad de derivar a hESCs baja/nula. Este hecho nos hace sospechar que algunos preembriones que hubieran podido tener categoría A ó B previo a la congelación, pasaron a preembriones de categoría C ó D al ser descongelados, como el preembrión número 28, que habiendo sufrido lisis de dos de sus blastómeras (5 morfológicamente normales+2 lisadas) (Figura 1A), con la consecuente bajada en el criterio de valoración ASEBIR de categoría B a categoría D (Tabla 1), llegó al estadio de blastocisto (Categoría ASEBIR D), aunque después no fuimos capaces de aislar la MCI (Tabla 2). Además, somos conscientes que la presencia de estos restos de lisis celular pueden dificultar, aún más que la presencia de fragmentos citoplasmáticos,

la formación de blastocistos de buena calidad (Figura 1B).

Con respecto a los parámetros morfológicos a evaluar por ASEBIR en el estadio de D+2 y D+3, vimos concordancia entre los diferentes criterios de valoración en todas las variables consideradas, excepto en la que se refiere a número celular y ritmo de división. Aunque la hora de la congelación no es un dato que nos hayan facilitado los Centros de Reproducción, obviamos que estuvo en todos los casos dentro de los intervalos de observación recomendados por ASEBIR, siendo en D+2: 44-47 horas post-inseminación, y en D+3: 67-71 horas post-inseminación. En nuestra experiencia tuvimos el claro ejemplo del preembrión 27, que teniendo calidad 5CI por los criterios tradicionales, se clasificó con categoría D según ASEBIR debido a un ritmo de división algo más lento (Tabla 1), llegó al estadio de blastocisto, y tuvimos éxito en el aislamiento de la MCI para intentar la derivación de hESCs (Tabla 2).

Nos ocurrió lo mismo a la hora de comparar los distintos criterios de

Figura 1 Ejemplos representativos de preembriones descongelados en el BACM.



1A: Preembrión en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que pasó de ser 7CII a 5CIII, con lo que bajó según los criterios de ASEBIR de categoría B a categoría D.

1B: Ejemplo representativo de un preembrión en día +5 donde se observa que los restos de células lisadas están impidiendo que el blastocelo pueda ocupar todo el volumen del preembrión. La flecha blanca indica los restos de la célula lisada.

1C: Preembrión en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que poseía calidad tipo II debido a la forma elíptica de la zona pelúcida. Según los criterios de ASEBIR se trata de un preembrión con categoría D, debido al bajo número de células.

1D: Preembrión en día +6, donde se observó la evolución a un blastocisto de calidad 4AA según Gardner, y que debido a que no llegó a organizarse en blastocisto en día +5 pasó a tener calidad C según los criterios de ASEBIR.

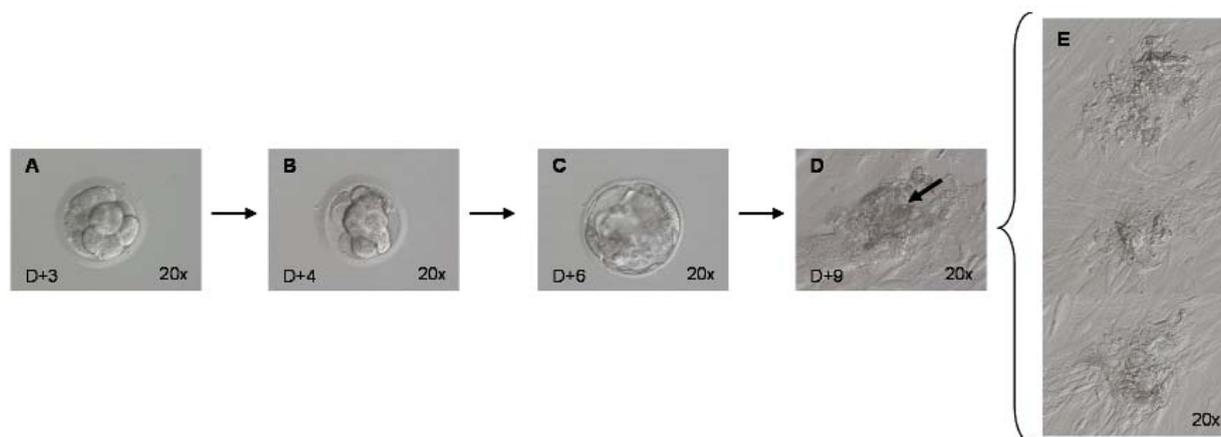
valoración de la calidad cuando observamos el estadio de blastocisto. Mientras que vimos concordancia a la hora de evaluar las variables consideradas por ASEBIR como el aspecto de la zona pelucida, aspecto y tamaño de la MCI y del trofoectodermo, y el grado de expansión, cuando evaluamos el día de organización del blastocisto pudimos comprobar que algún preembrión que alcanza una calidad blastocitaria óptima respecto a las demás variables, pasó a ser categoría C solamente porque se organizó en blastocisto en D+6, en lugar de en D+5. Esto le ha ocurrido en nuestro trabajo al preembrión 13 (Tabla 2). Teniendo en cuenta que procedía de un preembrión ya catalogado como categoría D cuando estaba en D+3, es lógico pensar que iba a llevar acumulado este retardo en su desarrollo (Figura 1C, D). Por tanto la variable de número celular y ritmo de división es para nosotros

independiente de la calidad morfológica que se consiga, ya que al preembrión 13 también pudimos aislarle la MCI. Además, el hecho de que todos los preembiones que llegaron a blastocisto fueran congelados en día +3 corrobora los estudios reproductivos en los que mantener en cultivo los preembiones un día más antes de la crioconservación (Día+2 vs. Día+3) permite seleccionar mejor la calidad de estos (Sifer et al., 2006). Esto puede tener implicaciones importantes para la selección de preembiones congelados destinados a derivar hESCs.

La tasa de éxito en la derivación de hESCs sigue siendo baja actualmente, necesitándose un gran número de preembiones para poder derivar un número bajo de líneas establecidas y caracterizadas, sobre todo cuando los preembiones a los que se puede optar son los sobrantes de las técnicas de reproducción asistida, y que, por tanto,

no fueron prioritarios a la hora de realizar la transferencia. Este hecho ha dado lugar a que muchos grupos de investigación inmersos en la derivación de hESCs utilizando tanto preembiones frescos como congelados, comiencen a tener en cuenta la calidad embrionaria de estos preembiones (Zhang et al., 2006; Lerou et al., 2008). En nuestra experiencia, las colonias que tenemos actualmente han procedido de un preembrión de categoría A, y que evolucionó a un blastocisto de categoría D, en el caso del preembrión 24 (Figura 2), y de un preembrión de calidad D, que evolucionó a un blastocisto de categoría D, en el caso del preembrión 27 (Figura 3), lo que nos hace ver una vez más que el número celular y el ritmo de división en nuestra experiencia puede no ser un factor limitante sobre la posibilidad de éxito en derivación.

Figura 2 Evolución a blastocisto y aislamiento de la MCI del preembrión 24.



1A: Preembrión 24 en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que pasó de ser 8CI a 7CII, aunque mantuvo la categoría A según los criterios de ASEBIR.

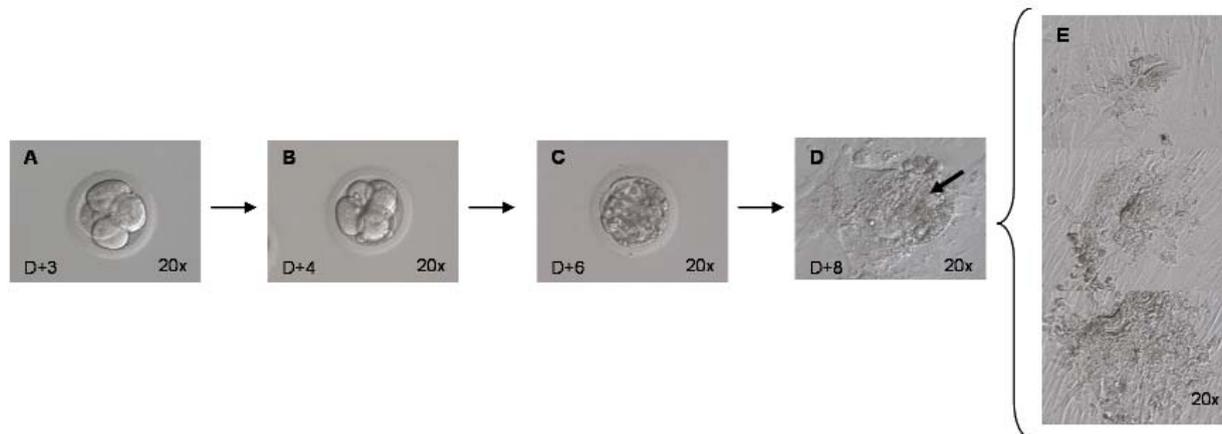
1B: Preembrión 24 en día +4, donde observamos la compactación en mórula.

1C: Preembrión 24 en día +6 donde ha alcanzado el estadio de blastocisto con una calidad 4BB según Gardner, y que debido a que no llegó a organizarse en blastocisto en día +5 pasó a tener calidad D según los criterios de ASEBIR.

1D: Colonia primaria del preembrión 24 en día +9, una vez liberado de la zona pelucida y colocado en "feeders". La flecha negra indica donde estaría situada la MCI.

1E: Colonias con morfología similar a hESCs del preembrión 24 tras pase a "feeders" frescos una vez aislada la MCI.

Figura 3 Evolución a blastocisto y aislamiento de la MCI del preembrión 27.



1A: Preembrión 27 en día +3 inmediatamente después de ser descongelado, y que conservó una calidad de 5CI. Según los criterios de ASEBIR se trata de un preembrión con categoría D, debido al bajo número de células.

1B: Preembrión 27 en día +4, donde observamos división celular.

1C: Preembrión 27 en día +6 donde ha alcanzado el estadio de blastocisto con una calidad 3BB según Gardner, y que debido a que no llegó a organizarse en blastocisto en día +5 pasó a tener calidad D según los criterios de ASEBIR .

1D: Colonia primaria del preembrión 27 en día +8, una vez liberado de la zona pelucida y colocado en "feeders". La flecha negra indica donde estaría situada la MCI.

1E: Colonias con morfología similar a hESCs del preembrión 27 tras pase a "feeders" frescos una vez aislada la MCI.

Desde el BACM opinamos que la propuesta de ASEBIR para estandarizar los criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos es muy positiva y extrapolable en su mayor parte a la manipulación de estas células para propósitos diferentes de la reproducción, aunque creemos que es necesario publicar un anexo que se refiera concretamente a los preembriones congelados, y que no sea tan exigente con la variable de número de células y ritmo de división. Este anexo específico para estos preembriones sería útil tanto para el propósito de derivación de hESCs, donde la evolución de los preembriones al estadio de blastocisto es necesaria, como para los programas de criotransferencia que se realicen dentro de los Centros de Reproducción Asistida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (Proyecto 0030/2006 TC y MR). Queremos agradecer al Servicio Andaluz de Salud, a la Fundación Progreso y Salud, a ANACER y al Instituto de Salud Carlos III su continua colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

ASEBIR, II. Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de Embriología Clínica. 2007.

Calderón G, Prados N, Caligara C, Mantuana E, Navarro J, Pellicer A, Remohí J. Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J, editors. Reproducción

Humana. 2º ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España; 2002. p. 463-468.

Cortés JL, Cobo F, Cabrera C, Barnie AH, Catalina P, Nieto A, Montes R, Barroso A, Concha A. Nuevas perspectivas para el embriólogo: papel en el Banco de Líneas Celulares de Andalucía (Nodo Central Banco Nacional de Líneas Celulares). Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de Reproducción (ASEBIR). Vol. 11, nº 2. p 11-14, Diciembre 2006.

Cortés JL, Cobo F, Barnie AH, Catalina P, Cabrera C, Nieto A, Montes R, Concha A. Role of the embryology laboratory in the human embryonic stem cell line derivation process. Cytotechnology 2006;52:1-11.

Cortés JL, Antiñolo G, Martínez L, Cobo F, Barnie A, Zapata A, Menéndez P. Spanish Stem Cell Bank interviews examine the interest of couples in donating surplus

human IVF embryos for stem cell research". Cell Stem Cell. 2007;1:17-20.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil Steril. 1998;13:3434-3440.

Lerou PH, Yabuuchi A, Huo H, Takeuchi A, Shea J, Cimini T, Ince TA, Ginsburg E, Racowsky C, Daley GQ. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. Nat Biotechnol. 2008 ;26:212-214.

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. BOE núm 126: 19947-19956.

Ley 14/2007, de 3 de Julio, de investigación biomédica. BOE núm 159: 28826-28848.

Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: a journey beyond cell replacement therapies. Cytotherapy 2006;8:530-541.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. BOE núm 270: 39475-39502

Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Martin-Pont B, Porcher R, Hugues JN, Wolf JP. Day 3 compared with day 2 cryopreservation does not affect embryo survival but improves the outcome of frozen-thawed embryo transfers. Fertil Steril 2006;86:1537-1540.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282:1145-1147

Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. Fertil Steril. 1988; 49:822-826. Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. Stem Cells. 2006;24:2669-2676.

Sistemas Genómicos compañía líder en análisis de ADN

Servicio integral de Genética aplicado a la Medicina

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

GENÉTICA MÉDICA

Nuevas herramientas diagnósticas para la mejora de su práctica clínica

CONSEJO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRENATAL

ENFERMEDADES RARAS

CÁNCER HEREDITARIO

GENÉTICA ONCOHEMATOLÓGICA

ESTUDIOS GENÉTICOS A MEDIDA

GENÉTICA REPRODUCTIVA

Una manera sencilla de ofrecer DGP a sus pacientes

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL (DGP)

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

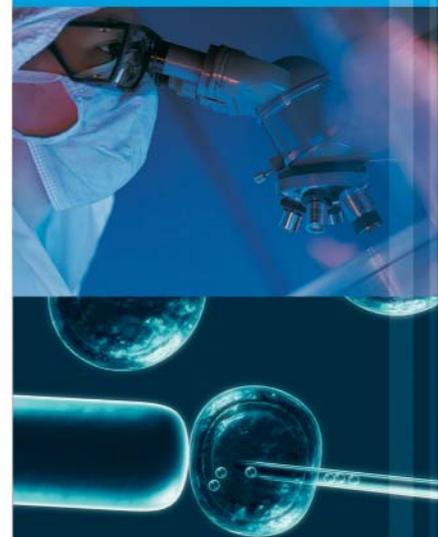
INFERTILIDAD GENÉTICA

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA DONANTES DE GAMETOS Y EMBRIONES

CONSEJO GENÉTICO REPRODUCTIVO

 **sistemas genómicos**
BIOMÉDICA

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



Solicite nuestro catálogo
902 364 669

Introducing the G5 Series.™

Optimising embryo development
in a protective in vitro environment.



The G5 Series.™
Helping nature succeed.



www.embiol.com

Vitrolife 

Innovative Cell and Tissue Technology

Vitrolife distributor: Equipos Médico-Biológicos, C/Can Ràbia 13, 08017 Barcelona, Tel: 934 123 721, Fax: 934 122 192, Email: barcelona@embiol.com, www.embiol.com
Vitrolife Sweden AB, Faktorvägen 13, SE-434 37 Kungälv, Sweden. Tel: +46-31-721 80 00, Fax: +46-31-721 80 90, E-mail: fertility@vitrolife.com



INCIDENCIA DE MULTINUCLEACIÓN EN IVF-ICSI

MULTINUCLEATION INCIDENCE IN IVF-ICSI

Brossa M., Blanch X., Antich M.
FertiLAB, Institut Català de Fertilitat, Barcelona, España.

RESUMEN

La multinucleación (MNC), definida como la presencia de al menos una célula con dos o más núcleos, es un fenómeno habitual en los laboratorios de FIV y se ha correlacionado negativamente con las tasas de implantación. El objetivo de este estudio fue evaluar la incidencia de multinucleación en día 2 en los embriones procedentes de ciclos de FIV – ICSI realizados en nuestro centro entre el 31 de enero de 2005 y el 31 de diciembre de 2006, valorando si se observaba alguna relación con el número de ovocitos obtenidos por ciclo, la dosis de FSH utilizada en la estimulación, la técnica de inseminación (FIV o ICSI) y el grado de fragmentación embrionaria.

Palabras clave: multinucleación/ número de ovocitos/ FSH/ FIV/ ICSI/ fragmentación embrionaria.

SUMMARY

Multinucleation, defined as the presence of at least one cell with two or more nuclei, is a usual phenomenon in IVF laboratories and it has been negatively correlated with implantation rate. The objective of this study was to evaluate the incidence of multinucleation in day 2 embryos proceeding from IVF-ICSI cycles realized in our laboratory between January 31th of 2005 and December 31th of 2006, evaluating if some relation was observed with the number of oocytes retrieved per cycle, the total dose of FSH used during stimulation, the insemination technique (IVF or ICSI) and the fragmentation grade of the embryos.

Key words: multinucleation/ oocytes number/ FSH/ IVF/ ICSI/ embryo fragmentation.

INTRODUCCIÓN

Es mucha la bibliografía que se ha escrito describiendo qué parámetros son los adecuados en la valoración de los embriones para intentar encontrar cuáles de ellos son los que tienen una mayor probabilidad de implantación. En la transferencia de embriones en estadio celular (D+2 ó D+3), la valoración del número de células, la simetría entre blastómeras, el grado de fragmentación y la presencia de multinucleación (MNC) suelen ser los principales parámetros a tener en cuenta para decidir qué embrión o embriones son los óptimos para transferir. La multinucleación es un fenómeno habitual en los laboratorios de FIV y se ha relacionado con la presencia de alteraciones genéticas en los embriones en los que se observa, así como con una menor tasa de implantación, a pesar de que, en cultivo, a menudo los embriones que presentan MNC son capaces de desarrollarse hasta estadio de blastocisto.

Hay cierta variabilidad en lo que a incidencia de MNC se refiere en la

bibliografía, tanto cuando se valora por número de ciclos como cuando se valora en relación al número de embriones con MNC. En cualquier caso y, debido a la menor tasa de implantación que lleva asociada, la MNC es un fenómeno a evitar, por lo que resulta importante saber cuáles son las razones que favorecen su aparición para así poder evitarlas.

A partir del estudio realizado por Eric Van Royen et al. (Human Reproduction 18, 1062-1069) hemos realizado en nuestro centro un análisis retrospectivo y descriptivo de la incidencia de multinucleación (MNC) en D+2 en embriones de FIV-ICSI en relación a: número de ovocitos obtenidos por ciclo, dosis de FSH utilizada en la estimulación, técnica de inseminación (FIV o ICSI) y grado de fragmentación embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos analizado 3224 embriones obtenidos en 460 ciclos realizados en nuestro centro entre el 31 de enero de

2005 y el 31 de diciembre de 2006 (350 ciclos correspondían a pacientes y 110 a casos de donación de ovocitos; el promedio de edad era, respectivamente, 34.7 y 26.1 años).

Para la preparación de las muestras de semen, se utilizó el protocolo estándar de centrifugación en gradientes de densidad (75% - 90%) (Puresperm 100, Nidacon) y dilución del pellet recuperado en medio IVF (IVF Medicult).

Tras la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito (CCO) bajo lupa en el laboratorio, estos se mantuvieron en placas de 4 pocillos con G-Fert (Vitrolife) en incubador a 37 °C, 6% CO₂. En los casos de FIV convencional, se cambiaron los CCO a pocillos de 0,5 ml de IVF (IVF Medicult) a razón de entre 3 – 5 CCO por pocillo, mientras que los ovocitos destinados a ICSI, se colocaron en gotas de 35 µl de Hyasa (COOK) durante 30 segundos para, acto seguido, denudarlos mecánicamente por pipeteo con pipetas de diámetro decreciente en gotas de 30 l de MOPS (Vitrolife). Una vez denudados los ovocitos, estos eran

incubados en un pocillo limpio de G-Fert hasta el momento de la microinyección.

En los ciclos de fecundación mediante FIV convencional, para la co-incubación entre los CCO y los espermatozoides se utilizó medio IVF (IVF, Medicult) a 37 °C, 6% CO₂ durante un tiempo de inseminación de entre 3 – 5 horas, pasadas las cuáles se cultivaban los CCO de forma individualizada en microgotas de 30 l de G1 hasta la valoración de pronúcleos.

Se realizó ICSI en todos los ovocitos maduros en los casos en que la muestra era indicada para ello y en al menos la mitad de los ovocitos en la práctica totalidad de los ciclos con recuperación espermática suficiente para la FIV convencional, para evitar posibles fallos de fecundación en FIV con la consiguiente imposibilidad de transferencia embrionaria.

El cultivo de los ovocitos se realizó en placas Falcon embriotesadas, bajo aceite (COOK Oil) en gotas de G1 de 30 l, en un incubador (Labotect Incubator C200) a 37 °C y al 6% CO₂.

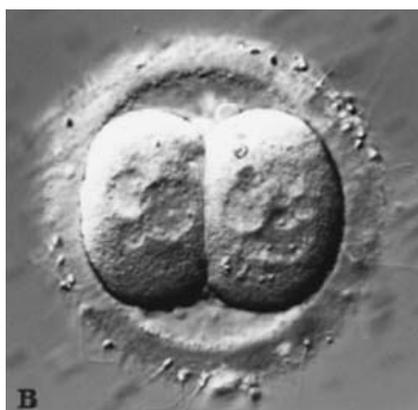
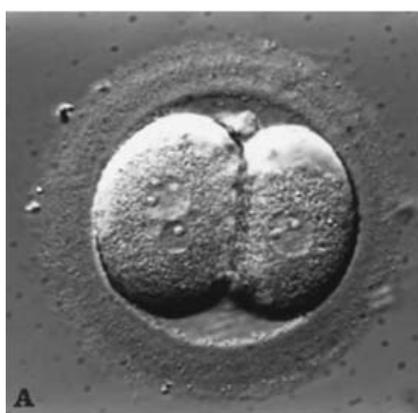
La valoración de los pronúcleos (a las 18h + 2) así como la división embrionaria (a las 42h + 2) se realizó en microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 a 400X y girando el embrión si era necesario para la observación de los núcleos en las distintas células.

Para la valoración de los resultados, a partir de la tasa de MNC general de nuestro laboratorio (ver apartado Resultados), se establecieron dos grupos según presentaran una tasa de MNC por caso comprendida dentro de los valores normales o una tasa de MNC por caso más elevada de lo esperado. Para cada uno de estos grupos se valoró la tasa de MNC según la dosis de FSH utilizada y la recuperación ovocitaria el día de la punción conjuntamente.

RESULTADOS

En el artículo publicado por Eric Van Royen et al. estudiaron, entre otros parámetros, la incidencia de multinucleación (definida como la presencia de al menos una célula con dos o más núcleos – ver figuras A, B y figuras

1, 2 –) en relación al número de ovocitos recuperados, la dosis de FSH total utilizada en la estimulación y la técnica de inseminación (FIV convencional vs. ICSI). Encontraron diferencias significativas en los casos en que se recuperaron 10 o más ovocitos por punción, así como las estimulaciones con dosis mayores o iguales a 2400 UI de FSH y en aquellos embriones con fragmentación mayor al 10%. La proporción de multinucleación en ICSI versus FIV fue de 1.06.



Figuras A y B. Embriones en D+2 con presencia de blastómeras multinucleadas.

(Fotografías: Hanna Balakier & Ken Cadesky)



Figura 1. Embrión en D+2 procedente de ICSI con MNC en una de las blastómeras.

Figura 2. Embrión en D+2 procedente de FIV clásica con una blastómera trinucleada.

(Fotografías de embriones de nuestro centro)

A partir de estos valores, tomándolos como punto de corte, analizamos la incidencia de MNC en nuestro centro, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 1.

% MNC ≥ 15% n = 123 (26.7%)	
Dosis ≥ 2400 UI	Dosis < 2400 UI
n = 79 (64.2%)	n = 44 (35.8%)
< 10 ovo. Recuperados	< 10 ovo. recuperados
n = 19 (24.1%)	n = 8 (18.2%)
≥ 10 ovo. Recuperados	≥ 10 ovo. recuperados
n = 60 (75.9%)	n = 36 (81.8%)

% MNC < 15% n = 337 (73.3%)	
Dosis ≥ 2400 UI	Dosis < 2400 UI
n = 210 (62.3%)	n = 127 (37.7%)
< 10 ovo. recuperados	< 10 ovo. recuperados
n = 112 (53.3%)	n = 32 (25.2%)
≥ 10 ovo. recuperados	≥ 10 ovo. recuperados
n = 98 (46.7%)	n = 95 (74.8%)

Tabla1: Resultados de MNC en relación a la dosis de FSH utilizada y del número de ovocitos recuperados en punción.

De un total de 3224 embriones obtenidos en 460 ciclos de FIV-ICSI realizados, observamos MNC en 376 embriones (11.7%), en 184 de los ciclos con uno o más embriones multinucleados (40.0%).

A partir del valor obtenido, establecimos como límite de normalidad para MNC en nuestro laboratorio los casos con menos de un 15% de embriones

multinucleados. Observamos entonces para cada uno de los dos grupos (con mayor y con menor tasa de MNC de la esperada) la incidencia según la dosis de FSH utilizada durante la estimulación y, dentro de estos subgrupos, la incidencia en función del número de ovocitos recuperados. Según esto, no pareció observarse mayor MNC teniendo en cuenta sólo la dosis de FSH utilizada, pero sí se observó que la incidencia de MNC aumentó más de lo esperado en aquellos ciclos en que, usando una dosis > 2400 UI de FSH, se recuperaron más de 9 ovocitos (75.9% comparado con un 46.7% esperado) (ver Tabla 1).

De un total de 1736 embriones con < 10% de fragmentación, 198 presentaron MNC (11.4%), mientras que de los 1488 embriones con > 10% de fragmentación, 178 presentaron MNC (12.0%), no apreciándose diferencias importantes entre los dos grupos.

Para las transferencias embrionarias, cuando era posible, se elegían aquellos embriones que más se aproximaban a los parámetros ideales de división: 4 células en Día 2, grado de fragmentación < 10%, con blastómeras simétricas y regulares y en los que no se hubiera observado MNC.

Así pues, cuando fue posible, no se eligieron embriones que hubieran presentado MNC dada su reducida tasa de implantación. A pesar de ello, en ocasiones se realizaron transferencias mixtas (embriones en los que no se observó MNC y embriones con MNC) dado que eran transferencias no selectivas (no había otros embriones para seleccionar).

De un total de 40 embriones con MNC transferidos correspondientes a 36 transferencias, se ha observado embarazo con saco en 13 ocasiones. En 12 de los casos, se trató de transferencias mixtas de embriones con y sin MNC; de estos 12 casos, 3 terminaron en aborto. En un caso, la transferencia fue de un solo embrión, el cuál presentaba MNC; dio embarazo pero acabó en aborto de primer trimestre. Hubo dos casos de transferencias mixtas con embarazo bioquímico.

DISCUSIÓN

La MNC es un fenómeno habitual en los laboratorios de FIV y se ha

correlacionado negativamente con las tasas de implantación, debiéndose tener en cuenta a la hora de decidir qué embriones transferir.

A partir de las observaciones realizadas en nuestro centro vemos que, en los casos en que es necesaria una estimulación con dosis elevadas de FSH (dosis mayores a 2400 UI pero recuperaciones ovocitarias de menos de 10 ovocitos), la incidencia de multinucleación no parece aumentar, pero sí parece hacerlo en casos en que, con dosis elevadas, la recuperación ovocitaria es también elevada. A partir de esta observación, valoramos que sería conveniente ajustar bien las dosis en la estimulación, de manera que en buenas respondedoras no se dieran altas dosis, ya que la recuperación ovocitaria, si bien fuera algo menor, sería suficiente para asegurar un buen ciclo de FIV en el que, probablemente, hubiera menor incidencia de multinucleación.

Es muy probable que la mayor incidencia de MNC en estos ciclos se deba a que muchos de los ovocitos recuperados no han tenido tiempo de madurar correcta y completamente durante el reclutamiento folicular, a pesar de que en muchos casos se puede observar la presencia de corpúsculo polar.

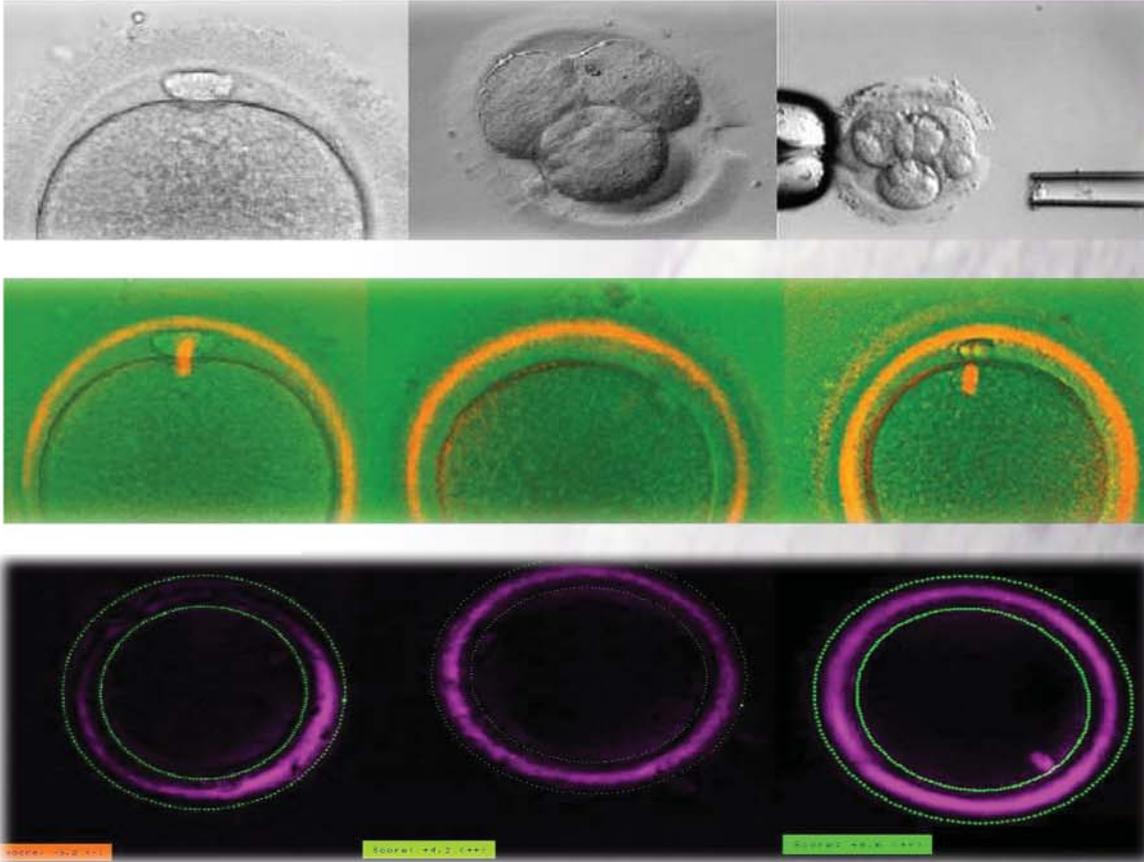
En lo que a tasas de gestación se refiere, no podemos sacar ninguna conclusión basándonos en nuestra experiencia, dado que sólo hemos realizado una transferencia con la totalidad de los embriones multinucleados (transferencia no selectiva de un solo embrión) o, en aquellas ocasiones en que se han realizado transferencias mixtas de embriones multinucleados junto con embriones sin MNC y se ha observado gestación, el número de sacos siempre ha sido inferior al número de embriones transferidos. Sólo hemos observado gestación evolutiva en dos de los casos correspondientes a transferencias mixtas, correspondientes a transferencias de tres embriones y embarazos gemelares. En dichos casos, no es posible asegurar cual de los tres embriones no implantó, pero dada la baja tasa de embarazo descrita en embriones multinucleados, no es ilógico pensar que los embriones que presentaron MNC no fueron capaces de implantar, si bien no afectaron a la

capacidad de implantación de los embriones que se transfirieron con ellos.

A la vista de los estudios presentados por tantos centros con respecto a la MNC y por nuestra propia experiencia, seguiremos considerando la presencia de MNC como un parámetro muy importante a la hora de decidir qué embriones son los más adecuados para la transferencia. Y, en la medida de lo posible, consideramos también muy importante ajustar los protocolos de estimulación a cada caso concreto para evitar su mayor incidencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod.* 2000 Dec;15(12):2634-43.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update.* 2003 May-Jun;9(3):251-62. Review.
- Hanna Balakier and Ken Cadesky. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres *Human Reproduction* vol.12 no.4 pp.800-804, 1997
- Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod.* 2001 Feb;16(2):313-8
- Munne S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2006 Feb;12(2):234-53. Review.
- Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. *Hum Reprod.* 2001 Feb;16(2):326-32.
- Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos *Human Reproduction* Vol.18, No.5 pp. 1062±1069, 2003
- Vlaisavljevic V, Cizek-Sajko M, Kovac V. Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil Steril.* 2006 Aug;86(2):487-9.



Descubra qué puede ofrecerle la tecnología de OCTAX...

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 Polar AIDE™

Visualización de la orientación del huso meiótico. Puntuación automática de la calidad de los oocitos.



CONSECUENCIAS DE LA ROTURA SIN SALTO (SS) DE LA MEMBRANA DE LOS OVOCITOS TRAS EL ICSI.

Consequences of a sudden breakage (SS) of oocyte membrane after ICSI

Martín M., Florensa M., Esbert M., Riqueros, M., Calderón A., Múgica A., Ballesteros A., Calderón, G.
IVI-Barcelona, Ronda General Mitre 14, 08017. Barcelona. Correspondencia: mmartin@ivi.es

RESUMEN

El objetivo de este estudio es evaluar de manera retrospectiva las consecuencias de la rotura, tipo Sin Salto (SS), de la membrana citoplasmática del ovocito durante la microinyección citoplasmática de espermatozoide (ICSI).

Se han incluido 226 ciclos de ICSI realizados desde octubre del 2004 hasta diciembre 2006 en el IVI-Barcelona. Se han dividido en dos grupos: grupo A (n = 111 ciclos, 1291 ovocitos, 225 ovocitos con rotura SS) en el que hay al menos un ovocito dentro de la cohorte con rotura SS y grupo B (n = 155 ciclos, 1348 ovocitos,) en el que no ha habido ningún ovocito con rotura SS en la cohorte. De los dos grupos se han calculado y comparado la tasa de degeneración ovocitaria y la tasa de fecundación. Una vez comprobada la fecundación se ha evaluado la evolución de los embriones en día 2 y día 3, siendo en este día cuando se realiza la transferencia embrionaria y, en caso de tener embriones sobrantes de suficiente calidad, se ha procedido a su congelación.

Se ha observado un aumento significativo ($p < 0.05$) en la degeneración de ovocitos del grupo A. Un 10% de los ovocitos con rotura tipo SS degeneran vs un 4% de los ovocitos que degeneran sin haber sufrido este tipo de rotura. Del mismo modo, se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la tasa de fecundación. Se encuentra una fecundación del 69% en los ovocitos que han tenido rotura SS vs un 75% de fecundación en los ovocitos del grupo B. Los resultados muestran que, una vez conseguida la fecundación, la probabilidad que un embrión sea transferido es independiente del tipo de rotura de la membrana ovocitaria, (28.2% en grupo A vs. 33.6% en grupo B).

En conclusión, según este estudio, la rotura del oolema de tipo SS no compromete al desarrollo ni a la calidad embrionaria, una vez superada la fecundación.

SUMMARY

The aim of this study was to assess the consequences of a sudden breakage (SS) of oocyte membrane while performing an intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

A retrospective analysis was performed on 226 cycles of ICSI in a 2 year period in our clinic. We categorized them in 2 groups: group A in which at least one oocyte presents SS breakage (n = 111 cycles, 1291 oocytes, 225 SS membrane breakage oocytes) and group B in which no oocytes present SS breakage (n = 1555 cycles, 1348 oocytes). We evaluate degeneration and fertility rate of each group. Once fertilization was assessed, embryo quality was evaluated in Day2 and D3. In this day, we performed the embryo transfer and in case of having a surplus of good quality embryos we proceed to freeze them.

Degeneration rate was significantly higher ($p < 0.05$) in group A compared with group B (10% vs 4% respectively). Fertility rate followed an exactly inverse pattern, being significantly lower ($p < 0.05$) in group A compared with group B (69% vs 75% respectively). Our data showed that, once fertilization was achieved, the probability of one specific embryo to reach the transfer does not depend on the kind of oocyte membrane breakage (28.2% Group A vs. 33.6% in Group B).

Thus, these data indicate that SS type of breakage do not jeopardize neither embryo development nor quality once fertilization is reached.

INTRODUCCIÓN

Entre las técnicas de reproducción asistida, la microinyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) es la técnica de fecundación asistida ampliamente utilizada desde que fue probada como la más eficiente en casos de esterilidad de causa masculina (Palermo et al., 1992).

Para una adecuada realización de la técnica, primero se deben elegir y preparar correctamente los gametos. El ovocito a microinyectar debe ser un

ovocito maduro (MII), es decir, que haya extruido el primer corpúsculo polar. Para poder observarlo, se le deben retirar las células del cúmulo que rodean la zona pelúcida. Este procedimiento recibe el nombre de decumulación. Por otra parte, el espermatozoide debe ser activado mecánicamente, rompiendo el flagelo con ayuda de la micropipeta. Así se estimulará la reacción entre los diferentes componentes citoplasmáticos de ambos gametos.

Con el ICSI se consigue microinyectar un

único espermatozoide con buena morfología y movilidad en la mejor zona del citoplasma del ovocito. De esta manera se superan los pasos preliminares de la fecundación in vivo, como la reacción acrosómica y la fusión de membranas de los gametos.

La microinyección espermática está indicada en aquellos casos donde hay un factor masculino relacionado con baja concentración espermática, movilidad y/o morfología alterada que impide una buena fecundación mediante la

inseminación convencional (FIV). Del mismo modo el ICSI se utiliza en casos de fallo de fecundación por FIV, de no gestación en diferentes intentos de inseminación artificial homóloga o heteróloga (IAH o IAD) y en casos de diagnóstico genético pre-implantacional por PCR. En estos casos, ni las células del cúmulo, ni los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida deben interferir en el resultado.

Esta técnica se lleva a cabo con la ayuda de un micromanipulador que dirige el movimiento de las dos micropipetas responsables del ICSI. Una de ellas (conocida como holding), mediante succión, sujeta el ovocito en la posición deseada para realizar el ICSI. Así, el ovocito se posiciona de manera que la zona del citoplasma adyacente al primer corpúsculo polar, donde teóricamente se encuentra el huso meiótico, queda alejada de la zona de microinyección evitando la posible desestructuración de la placa metafásica. La segunda micropipeta (la de inyección) perfora sin problemas la zona pelúcida y la membrana citoplasmática u oolema, para depositar el espermatozoide en el ooplasma (Remohí et al 2002).

El oolema suele presentar una elasticidad y resistencia determinada frente a la pipeta de inyección, y aunque se deben reducir al máximo los daños ocasionados al ovocito durante la rotura, no siempre es posible. Dependiendo de la calidad ovocitaria, del grado de maduración del citoplasma y de la propia membrana citoplasmática, la rotura de ésta se realizará de manera más o menos agresiva. En general, una cierta elasticidad en la membrana citoplasmática está relacionada con una buena calidad ovocitaria.

La categorización de los diferentes tipos de rotura de la membrana difiere entre los diferentes laboratorios de FIV. En 1995 se describieron 5 tipos de rotura diferentes: Tipo A, el oolema se rompe durante el proceso de introducción de la pipeta sin aplicar ningún tipo de aspiración del citoplasma; Tipo B, el oolema se rompe como consecuencia de una leve aspiración; Tipo C, el oolema se rompe aspirando muy fuerte, sobrepasando la zona pelúcida; Tipo D, el oolema se rompe después de la

reintroducción de la pipeta en otra área, aspirando poco citoplasma; Tipo E, el oolema se rompe debido a una fuerte aspiración después de la reintroducción de la pipeta en otra área (Nagy et al., 1995). Posteriormente, en 1996 se describieron 3 tipos de rotura diferentes: normal, rápida y difícil. La rotura normal se define como aquella en la que el oolema presenta cierta resistencia y se rompe al aplicar un poco de presión; una rotura rápida es aquella en la que el oolema se rompe durante el proceso de introducción de la pipeta sin presentar resistencia alguna; y finalmente una rotura difícil, aquella en la que se debe reintroducir la pipeta en otra área y en ocasiones aspirar citoplasma (Palermo et al., 1996).

En la actualidad, en el laboratorio de FIV de IVI Barcelona para describir los diferentes tipos de rotura no se excluye ninguna de las anteriores, y de esta manera se identifican 7 tipos de rotura diferentes: SS, A1, A2, A3, STA1, STA2, STA3. Rotura SS o Sin Salto, el oolema se rompe durante la introducción de la pipeta sin ningún tipo de resistencia; Rotura A1, el oolema se rompe al introducir la pipeta observándose previamente una invaginación en la membrana siendo esto síntoma de una cierta elasticidad. Rotura A2, cuando no es posible una rotura A1, el oolema se rompe como consecuencia de una leve aspiración del citoplasma. Rotura A3, el oolema se rompe después de una aspiración citoplasmática importante al presentar una mayor resistencia a la rotura. Rotura STA1 o Stiring, el oolema se rompe al reintroducir la pipeta en otra área aplicando una cierta presión. Rotura STA2, el oolema se rompe después de la reintroducción de la pipeta y una leve aspiración. Rotura STA3, el oolema se rompe después de la reintroducción de la pipeta y una importante aspiración.

Cada tipo de rotura tiene una repercusión sobre el ovocito y su posterior desarrollo. En los estudios realizados por Nagy et al. en 1995 y Palermo et al. en 1996, se encuentra una mayor tasa de degenerados y una menor tasa de fecundación cuando la rotura es de tipo A o rápida (según la categorización del IVI Barcelona una rotura de tipo SS) debido a una inmadurez del ooplasma y del oolema.

A las 17-20 horas posteriores a la microinyección, se comprueba la fecundación de los cigotos. Un cigoto correctamente fecundado debe tener 2 pronúcleos (el masculino y el femenino) y dos corpúsculos polares extruidos (el primario y el secundario). Se considera que la fecundación es anómala cuando en lugar de 2 pronúcleos, el cigoto presenta cualquier variación en número de éstos. (Remohí et al., 2000).

El desarrollo y la calidad de los embriones es valorado en día 2 y en día 3. El día de la transferencia se seleccionarán los embriones (1 o 2) de mejor morfología entre todos los de la cohorte embrionaria.

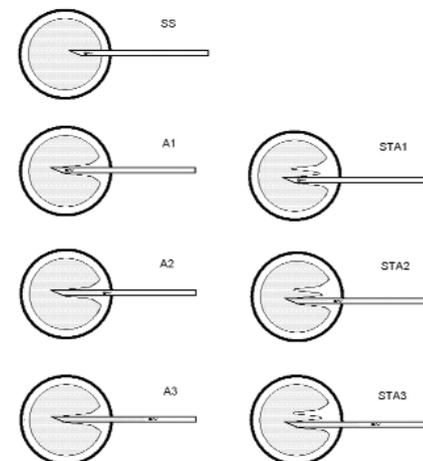


Fig1. Caracterización Roturas. IVI Barcelona

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es averiguar si, diez años más tarde, con el perfeccionamiento de la técnica y con la experiencia de los biólogos, una rotura sin salto (SS) sigue teniendo las mismas repercusiones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo en el que se han incluido 266 ciclos de Fecundación in Vitro realizados en nuestro centro desde octubre de 2004 hasta diciembre de 2006. Se trata de ciclos realizados con ovocitos propios en los cuales la técnica indicada para la inseminación es el ICSI. Se han dividido los ciclos en dos grupos: grupo A (n = 111 ciclos, 1291 ovocitos) en el que hay al menos un ovocito dentro de la cohorte con rotura SS y grupo B (n = 155 ciclos, 1348 ovocitos) en los que no ha

habido ningún ovocito con rotura SS en la cohorte. De cada grupo se ha valorado las tasas de degeneración, correcta fecundación y fecundación anómala. Por otro lado, se ha comparado el porcentaje de embriones transferidos o congelados según el tipo de rotura que se ha dado en el momento de la microinyección espermática.

RESULTADOS

Este estudio consta de dos grupos de pacientes: A y B, correspondientes a pacientes que han tenido algún ovocito con rotura SS durante la microinyección en su cohorte, y a pacientes que no han tenido ningún ovocito con rotura SS en su cohorte ovocitaria respectivamente.

Ambos grupos son comparables en tratamiento, edad media, número de ovocitos totales y número de ovocitos maduros.

y Grupo B

c) Chi cuadrado de Pearson: $p=0.002$
Diferencia fecundación anómala entre Grupo A y Grupo B

d) Chi cuadrado de Pearson $p>0.5$
Diferencia de transferencia entre Grupo A y Grupo B

f) Chi cuadrado de Pearson: $p=0.02$
Diferencia de tasa de congelados entre Grupo A y Grupo B

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio retrospectivo revelan que el tipo de rotura SS aumenta la probabilidad de degeneración y disminuye la tasa de fecundación de manera significativa, del mismo modo que reflejaban los estudios de Nagy et al. y de Palermo et al. una década atrás.

segundo corpúsculo polar (CP), el cual descondensa en el citoplasma, formándose un tercer pronúcleo.

La comparación del número medio de embriones transferidos y el porcentaje de embriones congelados en los grupos A y B, no muestra ninguna diferencia significativa. Se puede concluir que una rotura SS no compromete el desarrollo ni la calidad embrionaria de los ovocitos correctamente fecundados.

Una rotura SS provoca la disminución del número de embriones que forman la cohorte embrionaria de una paciente. Por lo tanto, para que existan más posibilidades de selección en el momento de escoger el mejor o los mejores embriones para la transferencia embrionaria, se debe intentar evitar al máximo una rotura SS.

BIBLIOGRAFÍA

Nagy ZP, Liu J, Joris G, Bocken G, Desmet B, van Ranst A, Vankelecom A, Devroey P, van Steirteghem AC. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Human reproduction* 1995; 10(12): 3171-3177.

Palermo G, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J, Rosenwaks Z. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 1996; 11(1): 172-176.

Remohí J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Manual práctico de la esterilidad y reproducción humana. Madrid, McGraw-Hill. Interamericana. 2000; p.392-401.

Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Reproducción Humana. Madrid, McGraw-Hill. Interamericana. 2002; p.443-453.

Trounson AO, Gardner DK. In Vitro Fertilization. Boca Raton, Florida, CRC. 2000.

Veeck LL. An Atlas of Human Gametes and Conceptuses. Londres, Parthenon Publishing. 1999; p. 32-39.

	EDAD	Ovocitos	MII	SS
GRUPO A	34.04 ± 3,74	1291	1078	225 (20.87%)
GRUPO B	34,83 ± 3,66	1368	1058	0 (0%)

Tabla 1. Características de los dos grupos incluidos.

A continuación se presentan, en la tabla 2, los resultados obtenidos en los diferentes grupos.

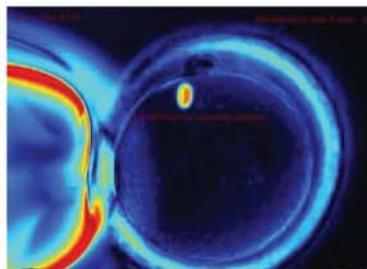
	T. degenerados %	T. fecundación %	T. Fecundación anómala (%)	T. Transferencia %	T. Congelados %
GRUPO A	10 ^a	69 ^b	9.8 ^c	28.2 ^d	25.0 ^f
GRUPO B	4	75	4	33.6	14.1

Tabla 2. Efecto de la rotura SS, comparándolo con la rotura no SS

a) Chi cuadrado de Pearson: $p=0.001$
Diferencia degeneración entre Grupo A y Grupo B

b) Chi cuadrado de Pearson: $p=0.01$
Diferencia de fecundación entre Grupo A

El aumento significativo de la tasa de fecundación anómala, como afirman Palermo et al. (1996) es debido a la fragilidad o inmadurez de la membrana plasmática, que dificulta la extrusión del



EQUIPOS PARA FIV

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



CONTROL DE CALIDAD

Medidores de PH, Volatiles, Particulas, Termometros...

 Quarmed, s.a.
 T 902102163 / F 915040440
 quarmed@quarmed.com
 www.quarmed.com



MEDIOS DE CULTIVO

HTF, Vitricificación, Aceite...

INTRODUCCIÓN A DEBATE

En este número se debate acerca de los Criterios de Clasificación Morfológica Embrionaria propuestos en el segundo cuadernillo ASEBIR de Embriología Clínica.

Para el siguiente os invitamos a participar en un tema de máxima actualidad en estos momentos y que está generando un amplio debate entre todos nosotros:

¿Cuál es vuestra opinión acerca del proceso, criterios y sistema de acreditación puesto en marcha por la ESHRE para Embriólogos Clínicos? Os invitamos a plasmar vuestras opiniones sobre este proceso.

CRITERIOS DE VALORACIÓN MORFOLÓGICA ASEBIR. NUESTRA EXPERIENCIA.

Mariona Hugas, Maria Fernández, Joan Sarquella. Unitat de Reproducció Humana i Diagnòstic Genètic. Clínica Girona

0 grado I ó II ó 7 puntos ó 8 ó 9... A nuestros embriones, con los que compartimos tantas horas en el laboratorio, siempre hemos tenido la "mala" costumbre de ponerles nota. Y claro, con la diversidad de la vida, si ellos son distintos, ¿que no será de nuestra forma de puntuarlos?

Es importante poder tener el mayor consenso a la hora de valorar la calidad embrionaria, no sólo para servir de ayuda para determinar los embriones con mejor calidad y potencial de desarrollo. Si no también para tener todos los mismos patrones, hablar el mismo idioma, utilizar el mismo baremo y así poder entendernos para realizar estudios multicéntricos o comparar bibliografía.

La Comisión de Trabajo de ASEBIR para la "Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de Oocito a Blastocisto" ha realizado un inmenso trabajo. Por un lado la revisión exhaustiva de más de 60 artículos. De ellos ha realizado una recopilación y ordenación de todos los datos, características y variables que influyen, de forma demostrada y significativa, sobre la tasa de gestación. Y por otro, ha establecido una gradación y unas claves esquemáticas claras y concisas, muy útiles para el trabajo diario del laboratorio y aplicables de forma rápida y sencilla por los embriólogos

para establecer las 4 categorías de calidad propuestas tanto para transferencias en D+2 como en D+3.

Es importante considerar que el Protocolo es abierto para que, cuando las evidencias científicas así lo permitan, poder incluir la valoración de los ovocitos y cigotos.

En el Laboratorio de FIV de nuestra Unidad empezamos a trabajar con estas pautas hace un año. Primero realizamos el estudio a fondo del "Librito azul" por todos conocido. Determinamos que por el momento, valoraríamos los embriones según nuestro "score" particular y a la vez con los Criterios ASEBIR.

En nuestra experiencia básicamente se practica la transferencia en el D+3. Y hemos transferido siempre que ha sido posible embriones de tipo A.

Después de este periodo de tiempo hemos detectado:

Un periodo de familiarización con los Criterios ASEBIR muy corto (pocos días). Estos días la valoración se realizaba siempre que era posible entre dos personas.

Mayor consenso entre los 3 embriólogos que valoramos los embriones en nuestro laboratorio.

Mayor consideración de la "historia" de cada embrión para la valoración del

grado de calidad. Si prescindimos de esta "historia", en algunos casos la clasificación de los embriones habría sido más benévola. Además hemos visto que hay que ser muy estrictos en respetar el "timing" de observación de los embriones.

Facilidad y claridad en la aplicación estas Pautas.

Aún no hemos realizado un estudio para ver posibles cambios en las tasas de embarazo y de supervivencia post-descongelación desde que aplicamos los Criterios. Vamos, sin duda, a seguir utilizando el sistema.

Felicitar sinceramente a todos los que han hecho posible la determinación de los Criterios ASEBIR. Muchas gracias. Y finalmente animar a todos a utilizarlos.

BIBLIOGRAFÍA:

Criterios de Valoración Morfológicos de Oócitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. Cuadernos De Embriología Clínica. Publicaciones Asebir 2007.

CRITERIOS DE VALORACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES ASEBIR.

Pepi Ferrando Conceptum. Institut de Fertilitat i Reproducció Humana. Reus.

Tras el congreso de ASEBIR en Bilbao decidí poner en marcha los criterios ASEBIR de valoración morfológica de embriones. Aunque todo cambio produce respeto creo que ha merecido la pena. Aquellos embriones que durante tantos años los había llamado 1, 2, 3 y 4 ahora se llaman A, B, C, D. Muchos de los embriones A son los que ya eran anteriormente de calidad 1 y los D calidad 4; creo por tanto que son los embriones de calidades intermedias los que se benefician de esta nueva

clasificación al tener los criterios más definidos. Para mí, la ventaja principal de la nueva nomenclatura está en la importancia que se le da a la trayectoria del embrión (ahora más estricta que antes). El hecho de que un embrión en D +2 con 2 células (en lugar de 4) de igual tamaño, no binucleadas y sin fragmentación sea de calidad B nos impide que en D +3 con 8 células simétricas, no binucleadas y con un 5% de fragmentación podamos llamarle de calidad A.

Aunque es pronto para evaluar los resultados, creo que la nueva valoración sigue un buen criterio para elegir 2 embriones óptimos a transferir y también seleccionar mejor los que se van a criopreservar. Aunque todo es mejorable y evidentemente el ojo del embriólogo tiene mucho que decir, creo que vale la pena el esfuerzo de unificar criterios entre centros.

EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE VALORACIÓN MORFOLÓGICOS DE OVOCITOS, PREEMBRIONES TEMPRANOS Y BLASTOCISTOS HUMANOS PROPUESTOS POR ASEBIR

José Luis Cortés, Pablo Menéndez Banco Andaluz de Células Madre. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Campus de la Salud.Granada

Ya ha transcurrido un tiempo suficiente para poder llevar a cabo una autocrítica sobre los nuevos criterios de valoración morfológicos propuestos por ASEBIR. Hemos tenido oportunidad de i) recibir y estudiar el ejemplar impreso, ii) atender las explicaciones de los autores de tan buen trabajo en distintos foros, y iii) aplicarlos en nuestros propios laboratorios. El objetivo principal de estos criterios ha sido poder estandarizar unas nociones que aunque en la mayoría de los casos coincidían, sobre todo para los preembriones de buena y mala calidad, sí que podían diferir en preembriones de calidad intermedia. Estas diferencias no sólo podían ser observadas entre embriólogos de distintas clínicas de FIV, sino que también podían darse entre distintos profesionales del mismo laboratorio. La falta de consenso en este aspecto tan importante de la embriología ha impedido durante muchos años generar estudios multicéntricos, interpretar informes clínicos de laboratorios ajenos, o comparar datos bibliográficos. Es más, en nuestro centro esta nueva propuesta nos ha sido muy útil, ya que la estamos

utilizando como control interno, e incluso "externo" de la calidad embrionaria de preembriones procedentes de distintos centros de reproducción. Aunque nuestro uso de los nuevos criterios de clasificación embrionaria está enfocado a la derivación de líneas celulares embrionarias humanas, y no a la transferencia de preembriones para un fin reproductivo, conocer la buena o mala calidad de un preembrión nos ha servido para entender qué preembriones llegan a blastocistos en laboratorios donde se cultivan sobre un cocultivo de fibroblastos, además de para decidir el método de derivación más adecuado, según la calidad de los blastocistos, para poder obtener células madre embrionarias humanas. En base a este hecho podemos decir que tenemos pruebas reales de la heterogeneidad entre distintos laboratorios a la hora de clasificar la calidad embrionaria, utilizando los sistemas de clasificación tradicionales.

Aunque no hemos tenido problemas importantes, al extrapolar los nuevos criterios de calidad en la manipulación

de preembriones para investigación, nos hemos encontrado un problema logístico. Esta guía está enfocada a evaluar preembriones frescos y no congelados, precisamente los únicos preembriones que podemos utilizar actualmente en España para investigación con células madre. Pensamos que este aspecto es uno de los que se debería de tratar en una futura actualización de estos criterios. Además, hemos observado un mayor grado de restricción en los parámetros de calidad óptima del preembrión y el blastocisto atendiendo al ritmo de división, lo cual en nuestros experimentos no fue muy aplicable, al intentar llevar a los blastocistos más allá del día 6 de desarrollo.

Esperamos ansiosamente que iniciativas como la que ha propuesto ASEBIR, acerca de nuevos criterios de valoración morfológicos de ovocitos, preembriones y blastocistos no quede en el olvido y sea discutida y actualizada a medida que vayamos adquiriendo un mejor conocimiento del desarrollo embrionario humano temprano.

¿CON CUÁL NOS QUEDAMOS?

Marta Brossa, Marta Antich, Xènia Blanch. Laboratorio Fertilab. Barcelona.

A raíz del último congreso ASEBIR en Bilbao, donde vimos que había gran interés por parte de todos los allí presentes (y los que no pudieron estar, seguramente también) en tener un mismo criterio de clasificación embrionaria y, dado que muchos laboratorios ya estaban aplicando el score propuesto por ASEBIR, decidimos en nuestro centro empezar a usarlo comparándolo con el score que hasta entonces aplicábamos (donde puntuábamos los embriones del 1 al 10), de modo que, aproximadamente en los últimos siete meses, hemos estado clasificando los embriones obtenidos en los ciclos realizados a través de ambos métodos simultáneamente. Aún no tenemos suficientes casos para realizar un estudio comparativo y decidirnos por uno de los dos criterios de clasificación, pero sí podríamos comentar algunos puntos a favor y algunos puntos en contra de la clasificación ASEBIR, más fruto de nuestra visión subjetiva que de razones derivadas de un estudio estadístico.

Así pues, como puntos a favor tendríamos:

- Tiene en cuenta el ritmo de división entre día 2 y día 3, mientras que con nuestro sistema de puntuación el score embrionario venía dado por el estado del embrión sólo en el día de la transferencia

(tanto si era en día 2 como si era en día 3). - Penaliza embriones en día 2 con número de células impares de forma más contundente. En nuestra clasificación, en lo que a número de células se refería, recibía la misma puntuación un embrión en 4 células que uno en 5.

- Diferencia las asimetrías “normales” de las “anormales”.

- Valora otros aspectos que hasta entonces no puntuábamos, como son la presencia de vacuolas, las alteraciones en la ZP...

En cambio, como puntos en contra vemos:

No hay posibilidad de promocionar embriones de día 2 a día 3.

En las alteraciones de ZP, en los casos en los que se realice AH vemos que el embrión “promociona” (o, al menos, no resulta penalizado), pero ¿por qué tiene que mejorar un embrión oval al que se ha hecho AH? ¿o uno con septo? (ya sabemos que nos quejamos de que con la clasificación ASEBIR no se promocionan embriones y, cuando se les promociona, también nos quejamos, pero es que ¿tenía que ser justo en este aspecto en el que se les valorara positivamente...?).

No se propone clasificación para

embriones descongelados.

Valora la presencia de multinucleación, pero no tiene en cuenta que en el embrión valorado se vean todas las células con núcleo o no. Es decir, no diferencia un embrión en 4 células con todas las células mononucleadas de uno de 4 con dos células mononucleadas y dos células a las que no se les vea el núcleo, cuando para nosotras será sin duda mejor el primero. Pero además, ¿cual sería mejor, ese embrión con dos células sin núcleo o un embrión de 4 células en el que no se vea ningún núcleo?

El uso simultáneo de los dos tipos de clasificación en nuestro centro nos está permitiendo decidir con mayor detalle los embriones óptimos para transferir, así que seguiremos con el uso de ambos para, más adelante y, en vista de los resultados que obtengamos, decidir si optamos por uno de los dos scores o seguimos con los dos.

Y ya que estamos, desde aquí nos gustaría animar al grupo de interés ASEBIR de calidad embrionaria para que, a partir de las recomendaciones en la clasificación de los ovocitos que presentaron, se propusiera un score también para ellos, para que pudiéramos valorar la evolución desde el día 0.

¿SERIA CONVENIENTE GENERALIZAR LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA EMBRIONARIA DE “ASEBIR”?

Miren Mandiola. Hospital Quirón Donostia – Quirón Bilbao.

Para concluir en “ la necesidad de aunar esfuerzos”, creo que primero deberíamos de hacer un repaso sobre cómo está la situación en nuestro entorno de trabajo.

En este mundo de globalización en el que en nos movemos, en el que las tecnologías informáticas nos permiten conocer hasta el más mínimo nuevo movimiento en cualquier parte del globo terráqueo, dónde las posibilidades de la estadística para tratamiento de datos son infinitas,

en este gran océano, nos encontramos nosotros, “ los embriólogos”.

Como pequeña introducción, me gustaría resaltar un hecho, el que las Unidades de Reproducción Asistida, han ido proliferando como si fueran “setas en un prado”, y si hace 15 años apenas eran un par de docenas en todo el territorio del estado español, actualmente están autorizadas por el Ministerio de Sanidad casi 300. Si bien,

todas ellas no poseen el mismo nivel de actuación, es decir que las autorizaciones de algunas de ellas se restringen a capacitación seminal, o solamente captación ovocitaria..... Así podemos comprobar que somos una especie en expansión, nada más lejos de la “extinción”, pero a la vez somos un colectivo, diverso, disperso y muy difícil para aunar esfuerzos y colaboraciones entre nosotros. Incluso, parece que nos invade el secretismo, no hay más que ver

cómo el número de centros colaboradores con los registros de la SEF, decae desde esos 300 centros a unos pocos más que 100.

Ahora bien, si reflexionamos un poco sobre la formación de los embriólogos, hay que reconocer que al no existir una formación reglada de base (Titulación Universitaria o formación de postgrado específica), " cada uno hace lo que puede", y tratándose de un mundo en el que el movimiento de dinero, la presión mediática y asistencial es bastante importante, no es raro encontrarse con una " Nueva Unidad de Reproducción" que de repente sale de la nada, con un ginecólogo y un embriólogo que ha estado 2-3 meses de visita en un laboratorio externo. (Que sirva de reflexión sobre las exigencias legales que deberían existir en cuanto a titulación y formación de los profesionales del laboratorio, previos a la apertura de una nueva Unidad de Reproducción).Si miramos al mundo médico, se necesitan

entre 3 y 5 años de formación regulada tras examen MIR para especializarse en algo y poder trabajar.

El número de Unidades no para de crecer, cada uno queremos ser especiales y hacer algo "diferente" del de la Unidad de al lado, y la dispersión y diversidad va en aumento.

Con este panorama, es con el que nos tenemos que manejar, y es aquí dónde adquieren gran relevancia los grupos de interés de las Sociedades científicas y su importancia para aunar criterios que todos deberíamos asumir.

Hay que felicitar a la Comisión de trabajo de ASEBIR, por su esfuerzo en hacer una exhaustiva revisión del tema " los criterios morfológicos en ovocitos, embriones tempranos y blastocistos" ya que esto nos permite tener consenso sobre los criterios de calidad embrionaria, nos permitiría estudios multicéntricos cuyos resultados podrían tener gran validez científica y

podrían permitirnos una mejora en nuestro servicio a los pacientes, que no debemos de olvidarnos que " a ellos nos debemos", no a nuestro "ego personal" de ser diferentes. Todo lo que pueda suponer una mejora en resultados y calidad, debería de ser adoptado, aun conociendo que cualquier modificación de los criterios propios supone un cambio en la rutina asistencial, y siempre es duro en sus inicios.

Para aportar nuestro granito de arena, en las Unidades de Reproducción de Quirón Donostia (San Sebastián) y Quirón Bilbao, estamos adaptándonos a los "criterios ASEBIR", que si básicamente son similares a los nuestros, no son exactamente iguales, pensamos que el esfuerzo merecerá la pena para todos. " OS ANIMO A HACERLO".

Espero que esta primera guía de ASEBIR, no sea la última, y siga en constante evolución como el mundo en el que vivimos.

A veces
sirven 9 meses

a BioCare
E u r o p e

solo 24/48
horas

"Calidad y eficiencia
para laboratorios
de Fiv"



www.biocareeurope.com
info@biocareeurope.com
Tel. +39.06.44.24.03.41
Fax +39.06.44.24.03.58



Somos los primeros
en conocerte ...

www.centromedicinaembrionaria.com

SERVICIOS

Servicio de diagnóstico genético preimplantacional

Estudio de aneuploidías
Estudio de reorganizaciones cromosómicas
Estudio de enfermedades monogénicas
Formación en las técnicas de biopsia y fijación

Servicio de biopsia testicular y estudio de meiosis

Realización de la biopsia testicular
Asesoramiento sobre la técnica de biopsia testicular
Valoración y asesoría de los resultados del estudio de meiosis

FISH en espermatozoides

Fragmentación del DNA

Consejo genético

Álvarez de Baena, 4 · 28006 Madrid · Tf. 91 411 50 80
Trias i Pujol, 5 · 08034 Barcelona · Tf. 666 582 141

Servicio de Diagnóstico Genético Preimplantacional

Esther Velilla García, PhD
María Oter Renom
Mercedes García Bermúdez, PhD
Silvia Fernández Fernández
Estefanía Toro Toro
Sara Corral Bermúdez

Servicio de Andrología

Ferran García José, MD

Asesor Científico

Juan G.Álvarez, PhD, MD



centro de medicina
embrionaria

www.centromedicinaembrionaria.com
pgd@pgdcem.com

... y sabemos que
crecerás sano



LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA REPRODUCCIÓN FEMENINA

Glucocorticoids and female reproduction

Raquel González, Montserrat Gomendio y Eduardo R. S. Roldan* Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), c/José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain. <http://www.gebir.csic.es> Correspondencia: E.R.S. Roldan, roldane@mncn.csic.es

RESUMEN

Los glucocorticoides ejercen multitud de funciones en el organismo para mantener la homeostasis, pero en condiciones de estrés, puede producirse la secreción de elevadas cantidades de éstos. Está ampliamente aceptado que los efectos del estrés pueden tener consecuencias negativas en la reproducción. Esta acción negativa está mediada principalmente a través de la alteración del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal, aunque existen evidencias que indican que los glucocorticoides tienen también un efecto directo sobre la esteroidogénesis y la oogénesis. Las acciones encaminadas a reducir los efectos negativos del estrés durante la aplicación de técnicas de reproducción asistida pueden favorecer el éxito de estas biotecnologías.

Palabras clave: estrés, glucocorticoides, reproducción

SUMMARY

Glucocorticoids exert their actions throughout the body to maintain homeostasis, but in stressful conditions, they can be secreted in high amounts. It is generally accepted that stress can negatively influence reproduction. This deleterious action is mediated mainly through the alteration of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. However, evidence suggests that glucocorticoids also have direct effects on steroidogenesis and oogenesis. Actions to reduce the negative effects of stress during the use of assisted reproductive technologies may enhance the outcome of these techniques.

Key words: stress, glucocorticoids, reproduction

CONCEPTO DE ESTRÉS TRADICIONAL Y MODERNO

El concepto de estrés ha adquirido considerable importancia en medicina humana ya que cada vez es mayor el número de personas que experimenta problemas, incluidos los de tipo reproductivo. En medicina veterinaria existe también una preocupación creciente (que es compartida por la población en general) por el bienestar animal que se ha traducido en la búsqueda de estrategias para contrarrestar los efectos negativos del estrés, tanto en animales domésticos en sistemas de producción, como en fauna silvestre mantenida en cautividad.

No existe un consenso universal en la definición de estrés ni tampoco en las variables que puedan medirlo de una forma objetiva. Frecuentemente se define como factores estresantes a

todos aquellos que producen una alteración en la homeostasis. La correspondiente respuesta de defensa frente a esta agresión se conoce como mecanismo de respuesta frente al estrés. Hans Selye describió la respuesta orgánica común a todos los factores que causan estrés como un síndrome general de adaptación en el que se produce una respuesta primaria o de alerta a través de la activación del eje simpático-adrenomedular con la liberación de catecolaminas (Ferin 2006). Posteriormente, se produciría una respuesta secundaria, de resistencia, que incluye la activación del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal y la liberación de corticosteroides de la corteza adrenal. Aunque algunos de los aspectos de la teoría acuñada por Selye siguen en vigor en la actualidad, el concepto de estrés ha ido evolucionando (para más información, ver McEwen y Wingfield 2003; Ferin 2006) y

actualmente se acepta que la respuesta orgánica es específica para cada factor y que la respuesta de adaptación al estrés necesita de la participación y coordinación de vías neuroendocrinas centrales y periféricas (Ferin 2006). En condiciones prolongadas de estrés, funciones no esenciales como la reproducción pueden verse alteradas o inhibidas a favor de la supervivencia.

NIVELES EN LOS QUE LA REPRODUCCIÓN PUEDE VERSE AFECTADA POR LOS GLUCOCORTICOIDES

En general, está ampliamente aceptado que la reproducción se ve negativamente afectada por los efectos del estrés crónico, pero los efectos que el estrés agudo, o agudo repetitivo, podrían tener en la reproducción aún no están bien esclarecidos (Tilbrook et al. 2000). Los corticosteroides, la hormona ACTH y el estrés pueden tener efectos inhibitorios

o, incluso, facilitatorios en la reproducción (Fig. 1) (Brann y Mahesh 1991; Sapolsky et al. 2000; Tilbrook et al. 2000). La reproducción femenina es más sensible a las alteraciones provocadas por el estrés que la masculina, debido a la sincronización que debe existir entre la secreción hormonal y los cambios morfológicos a todos los niveles del eje hipotálamo-hipofisario-ovario y útero.

Existe abundante información que indica que los glucocorticoides afectan al eje hipotálamo-hipofisario (Breen y Karsch 2006; Ferin 2006; Matteri et al. 2000; Vermeulen 2000). La mayoría de los factores que causan estrés inhiben la pulsatilidad tónica de la secreción de LH como resultado de la inhibición del generador de pulsos de GnRH o por cambios en la sensibilidad de las células gonadotropas a la estimulación por la GnRH (Ferin 2006). Las alteraciones frecuentemente observadas son la prolongación de la fase folicular, una fase lútea inadecuada y un pico preovulatorio de LH prematuro (Ferin 2006). Cuando las causas del estrés se cronifican o instauran pueden desarrollarse estados de hipogonadismo. En la mujer, el estrés psicogénico es el factor etiológico de la amenorrea funcional hipotalámica crónica, caracterizada por la supresión del ciclo menstrual e infertilidad y regresión del ovario a un estado similar al anterior a la pubertad. Esta amenorrea funcional hipotalámica está asociada a una secreción de cortisol elevada en comparación a mujeres con menstruación normal u otras causas de anovulación (Berga et al. 1997).

Sin embargo, la función gonadal podría verse afectada también de forma directa a nivel del ovario, tanto en la esteroidogénesis como en la oogénesis. El ovario es susceptible a la acción directa de los glucocorticoides; su acción está mediada por la presencia de receptores para glucocorticoides en las células ováricas (Schreiber et al. 1982; Tetsuka et al. 1999). Esta acción de los glucocorticoides en el ovario se encuentra modulada por la actividad de las 11b-hidroxisteroide-deshidrogenasas (11b-HSD). Hay dos isoenzimas que regulan la acción fisiológica de los glucocorticoides catalizando la interconversión del

cortisol/corticosterona (biológicamente activos) a sus respectivos metabolitos inertes (cortisona/11-dehidrocorticosterona). La isozima 11b-HSD 1 actúa predominantemente como una reductasa para incrementar la concentración local del cortisol, mientras que la 11b-HSD 2 actúa exclusivamente como una deshidrogenasa con elevada afinidad inactivando el cortisol (revisión en Michael et al. 2003).

El cortisol no se sintetiza de novo en el ovario (Omura y Morohashi, 1995) sino que se transporta desde las glándulas adrenales por la circulación sanguínea. La mayor parte del cortisol se transporta unido a proteínas plasmáticas y sólo una pequeña porción es libre y biológicamente activa. El cortisol se une principalmente a la proteína de unión a cortisol (CBP) o transcortina y con baja afinidad a la albúmina y a la proteína de unión a hormonas sexuales (SHBG) (Andersen 2002; Pugeat et al. 1981). Los niveles de cortisol libre en el fluido folicular son más elevados que en plasma (Andersen y Hornnes 1994; Harlow et al. 1997). Este incremento podría deberse al desplazamiento del cortisol de la proteína transportadora, transcortina, por parte de las altas concentraciones de progesterona y 17-a-OH-progesterona presentes en el fluido folicular de folículos preovulatorios (Andersen 2002).

RELACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA CONCEPCIÓN EN CICLOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

En la especie humana podría existir una relación entre el metabolismo del cortisol y la probabilidad de concebir en ciclos de fecundación asistida (Michael 2003). La tasa cortisol:cortisona refleja la actividad enzimática de las 11b-HSDs modulando la interconversión de estos glucocorticoides y la concentración local de los mismos. Varios estudios han encontrado una asociación entre una tasa elevada de cortisol:cortisona intrafolicular (consistente con una baja actividad ovárica de 11b-HSD) y una mayor probabilidad de éxito en los protocolos de reproducción asistida (Key et al. 2002; Lewicka et al. 2003; Thurston et al. 2003). Otros estudios no han encontrado una relación entre la concentración en el fluido folicular de

cortisol, cortisona o la proporción entre ambos y el potencial de implantación de los embriones derivados de los tratamientos de fecundación asistida (Andersen et al. 1999). Sin embargo, en la especie porcina las enzimas 11b-HSDs actúan en el oocito y en las células del cúmulo inactivando los glucocorticoides, mecanismo que podría ser importante para limitar posibles efectos negativos durante la maduración del oocitos (Webb y Michael, 2006). Un estudio reciente ha demostrado que la inactivación del cortisol por parte de las 11b-HSDs en las células de la granulosa en el cerdo incrementa a medida que el folículo se desarrolla y esta inactivación del cortisol está reducida de forma significativa en los quistes foliculares ováricos, implicando al cortisol en el crecimiento folicular y en el desarrollo de quistes (Sunak et al. 2007).

El éxito de los tratamientos de reproducción asistida puede verse afectado por el estrés asociado a la aplicación de estas técnicas. En la especie humana la fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) son técnicas que generan ansiedad y sus resultados pueden verse afectados. Así, se ha observado que los niveles de adrenalina en el momento de la recuperación de oocitos y las concentraciones de adrenalina y noradrenalina en el momento de la transferencia de embriones fueron más bajos en mujeres en los que el ciclo de FIV/ICSI fue exitoso que en las que no lo fue (Smeenk et al. 2005). Se ha asociado la vulnerabilidad al estrés con la FIV y transferencia de embriones, de tal forma que las mujeres que se someten a tratamientos de FIV y que presentan una mayor frecuencia cardíaca y presión arterial en respuesta al estrés, tienen un menor número de oocitos fecundables en comparación a las mujeres con respuestas menos exacerbadas (Facchinetti et al. 1997). Se ha observado igualmente en ciclos naturales, que el "distress" psicológico puede ser considerado como un factor de riesgo en el éxito de la concepción en mujeres con ciclos menstruales prolongados (Hjollund et al. 1999).

EFFECTOS DIRECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA ESTEROIDOGENESIS

La esteroideogénesis ovárica puede verse afectada por los glucocorticoides, cuyo efecto podría estar mediado por la alteración de la actividad de las enzimas que participan en su biosíntesis (Adashi et al. 1981; Schoonmaker et al. 1983). Estudios *in vitro* han mostrado que la dexametasona puede alterar la esteroideogénesis mediante la inhibición de la secreción de la LH (Huang y Li 2001) y que el cortisol inhibe la síntesis de pregnenolona estimulada por la LH (Michael et al. 1993). Ben-Rafael et al. (1988) encontraron un aumento en la producción de progesterona y estradiol por parte de las células de la granulosa, estimulada por el cortisol, pero a dosis suprafisiológicas.

EFFECTOS DIRECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA OOGÉNESIS

No se ha definido cuál es el papel del cortisol en el fluido folicular. Existe durante el pico de LH un incremento de los niveles de cortisol total y libre en el folículo (Andersen y Hornnes 1994; Harlow et al. 1997). Algunos estudios sugieren que el cortisol podría ejercer funciones en el desarrollo folicular y maduración del oocito (Fateh et al. 1989; Harlow et al. 1997) o que podría estar implicado en la respuesta anti-inflamatoria tras la ovulación (Andersen 2002). En mujeres a las que se aplicaron tratamientos de estimulación ovárica con hormonas se encontraron niveles de cortisol más bajos en el fluido folicular de folículos que contenían oocitos inmaduros que en folículos con oocitos maduros (Fateh et al. 1989). De igual forma, la concentración de cortisol fue significativamente superior en los fluidos foliculares de folículos que contenían oocitos maduros que no se fecundaron que oocitos maduros que se fecundaron y dividieron (Fateh et al. 1989).

Podrían existir diferencias especie-específicas en lo que se refiere al efecto directo de los glucocorticoides y la maduración del oocito. En peces el cortisol parece estimular la maduración del oocito (Greeley et al. 1986). Estudios realizados en mamíferos sobre la influencia de los glucocorticoides en la

oogénesis son contradictorios. Así, los estudios realizados *in vitro* en oocitos de cerdo han mostrado que la maduración se ve inhibida en forma tiempo- y dosis-dependiente (en un rango de 0.1-10 µg/ml) cuando los oocitos se exponen a la dexametasona o al cortisol (Yang et al. 1999). Sin embargo, la capacidad de los oocitos madurados *in vitro* de ser fecundados no se vio afectada por su exposición previa a la dexametasona (Yang et al. 1999). Este efecto inhibitorio no se produjo cuando se empleó el antagonista de receptores de glucocorticoides RU-486, lo que podría implicar al receptor de los glucocorticoides en procesos de reinicio y maduración del oocito (Yang et al. 1999).

Por otro lado, estudios realizados en ratón no mostraron efecto inhibitorio de los glucocorticoides (dexametasona, 1-20 µg/ml y cortisol, 0.1-10 µg/ml) en la maduración de oocitos *in vitro* tanto en maduración espontánea como en la maduración inducida por FSH en presencia de hipoxantina (Andersen 2003).

El posible mecanismo de acción de los glucocorticoides sobre el oocito no se conoce. El efecto inhibitorio de los glucocorticoides encontrado en el estudio de Yang et al. (1999), ha sido parcialmente atribuido a la reducida cantidad del complejo p34cdc2-ciclina B1 (MPF, factor promotor de la meiosis) (Chen et al. 2000), complejo clave en la regulación del ciclo celular en el oocito (Abrieu et al. 2001).

En un estudio reciente en ratón se ha evaluado el efecto de la dexametasona en un bioensayo a nivel folicular, evaluando la foliculogénesis, la producción de esteroides, la oogénesis y la calidad del oocito. Este trabajo reveló una ausencia de efecto de la dexametasona, cuando se empleó a concentraciones de hasta 40 µg/ml, en la foliculogénesis y oogénesis. Cuando se empleó una concentración de 80 µg/ml la dexametasona impidió la diferenciación folicular y maduración del oocito (Fig. 2). La esteroideogénesis se vio afectada a partir de una concentración de 5 µg/ml y el desarrollo embrionario temprano a partir de 10 µg/ml (Fig. 3) (Van Merris et al. 2007).

Estos estudios sobre el papel directo de los glucocorticoides en la oogénesis han mostrado que el efecto negativo potencial de los glucocorticoides se observa a dosis relativamente elevadas fuera del rango fisiológico, al menos *in vitro*, por lo que es probable que este efecto sea más farmacológico que fisiológico. Sin embargo, es necesario evaluar el efecto directo de los glucocorticoides sobre la oogénesis *in vivo*. Además, en casos de perturbación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que conlleven una producción elevada de glucocorticoides, se pueden producir interrupciones en el ciclo reproductivo y la función ovárica, alterándose el ambiente folicular en el que el oocito madura. Si el ambiente folicular no es adecuado, la competencia del oocito puede verse afectada negativamente repercutiendo en su capacidad posterior para generar embriones de calidad.

ESTRÉS Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN ANIMALES SILVESTRES EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

En los últimos años se ha producido un aumento en la preocupación por el bienestar animal y por los efectos que las prácticas de manejo tienen en los animales domésticos e igualmente por las condiciones en las que se mantienen y manejan a los animales silvestres en cautividad. El estrés de manejo y miopatía de captura son consecuencias importantes y frecuentes en animales salvajes. Puesto que las situaciones estresantes podrían alterar el correcto funcionamiento de cada componente del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, la reproducción puede verse afectada (ver Dobson y Smith 2000; Dobson et al. 2001).

La reproducción natural de animales salvajes en cautividad se encuentra limitada y el estrés está considerado como uno de los factores que contribuyen a esta reducida reproducción (Hutchings et al. 1996; Zhang et al. 2004; Swaisgood et al., 2006).

Las tecnologías reproductivas tienen un gran potencial en su posible aplicación en especies de fauna amenazada. El éxito de las biotecnologías reproductivas es aún muy limitado en estas especies (Comizzoli et al. 2000;

Pope 2000; Pukazhenthil and Wildt 2004) por numerosas causas entre las que se podrían destacar el desconocimiento general de la fisiología reproductiva de la mayoría de los animales salvajes, el escaso número de animales disponibles para la realización de estudios o la deficiente calidad del material obtenido para investigación. Además, el estrés derivado de las condiciones de cautividad y la mayor susceptibilidad de las especies salvajes al manejo intensivo suponen un factor adicional que contribuye al reducido éxito obtenido en estas especies.

El estrés inducido durante el manejo asociado a los tratamientos de reproducción asistida en muflones (*Ovis musimon*) podría contribuir a la reducida respuesta ovárica obtenida tras la superovulación. Además, la alta incidencia de regresión lútea temprana en hembras de muflón podría estar también asociada en parte al estrés repetitivo por la inmovilización de los animales durante los tratamientos (Ledda et al. 1995). El estrés de manejo se ha descrito como limitante en la aplicación de biotecnologías reproductivas en bisonte americano (*Bison bison*) (Dorn 1995). En nuestro trabajo de obtención de oocitos inmaduros mediante "ovum pick-up" por laparotomía, para su posterior maduración y fecundación *in vitro* en la gacela Mohor (*Gazella dama mhorr*), una de las hembras tuvo que ser retirada del experimento por estrés de manejo durante las capturas repetidas para la administración de FSH. Además, la respuesta general de las hembras de gacela al tratamiento de superovulación con FSH fue en general reducida (Berlinguer et al. 2008). El efecto del estrés asociado a las capturas repetidas durante el tratamiento hormonal, podría ser una causa que haya contribuido en parte a la limitada respuesta a la estimulación folicular.

El hecho de que el estrés pueda tener efectos deletéreos en la reproducción subrayan la importancia de evitarlo, o al menos minimizarlo en todo lo posible, bien sea para facilitar la reproducción natural o para aumentar las posibilidades de éxito en las ocasiones en que se requiera la aplicación de biotecnologías reproductivas.

La aplicación de tranquilizantes durante los citados procedimientos podría ser útil en la reducción del estrés de manejo, captura y contención en estas especies. Fernández-Arias et al. (2000) describió que el estrés de manejo durante los tratamientos asociados con protocolos de superovulación en cabra montés (*Capra pyrenaica*) puede conllevar un fallo completo en la tasa de fecundación. Estos autores encontraron que el tratamiento con tranquilizantes de acción prolongada permitió la superovulación de estos animales y la obtención de embriones con capacidad de desarrollo posterior (Fernández-Arias et al. 2000). En un estudio en muflones, la administración de decanoato de flufenacina permitió una mejora en la respuesta folicular tras la superovulación hormonal, además de facilitar la manipulación de los animales (Ptak et al. 2002). En un estudio reciente realizado por nosotros en gacela Mohor el uso de enantato de perfenacina durante la superovulación con FSH nos permitió mejorar las condiciones de manejo ya que los animales pudieron ser capturados a mano por los cuidadores y las hembras se mantuvieron más tranquilas haciendo que su manejo fuera más fácil y seguro. Además, en las hembras tratadas con el tranquilizante, el cortisol plasmático permaneció a niveles inferiores respecto a los controles durante los días de manejo más intenso (Fig. 4). Es importante señalar que las tasas de recuperación, fecundación y división no sólo no se vieron negativamente afectadas por la aplicación del tranquilizante de acción prolongada en el grupo de las gacelas donantes respecto al grupo control, sino que el porcentaje medio de maduración de los oocitos fue significativamente superior en el grupo tratado y la tasa de desarrollo embrionario fue ligeramente mayor en el grupo con tranquilizante, si bien las diferencias en este último parámetro no alcanzaron diferencias significativas probablemente por limitaciones en el número de animales disponibles para este estudio (González et al. 2008).

CONCLUSIONES

El estrés puede afectar el éxito reproductivo a distintos niveles. Los

distintos factores que generan estrés afectan a la reproducción de forma indirecta a través de la reducción de gonadotropinas actuando a través del eje hipotálamo-hipofisario, pero también pueden ejercer efectos directos a nivel del ovario alterando la esteroidogénesis y la oogénesis, pudiendo afectar finalmente a la competencia del oocito para su progresión en la meiosis y durante el desarrollo embrionario. La reducción del estrés asociado a los tratamientos de reproducción asistida tanto en medicina humana como en veterinaria puede conducir a una mejora en los resultados obtenidos tras la aplicación de biotecnologías reproductivas.

AGRADECIMIENTOS

RG ha disfrutado de una beca del programa I3P-CSIC. La financiación para el desarrollo de nuestra investigación ha provenido de los proyectos REN 2003-01587, CGL2006-13340/BOS y Acciones Integradas (HI20030336) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Figura 1: Esquema general de los efectos inhibitorios y estimuladores de los esteroides adrenales en la reproducción. Modificado de Braan y Mahesh (1991).

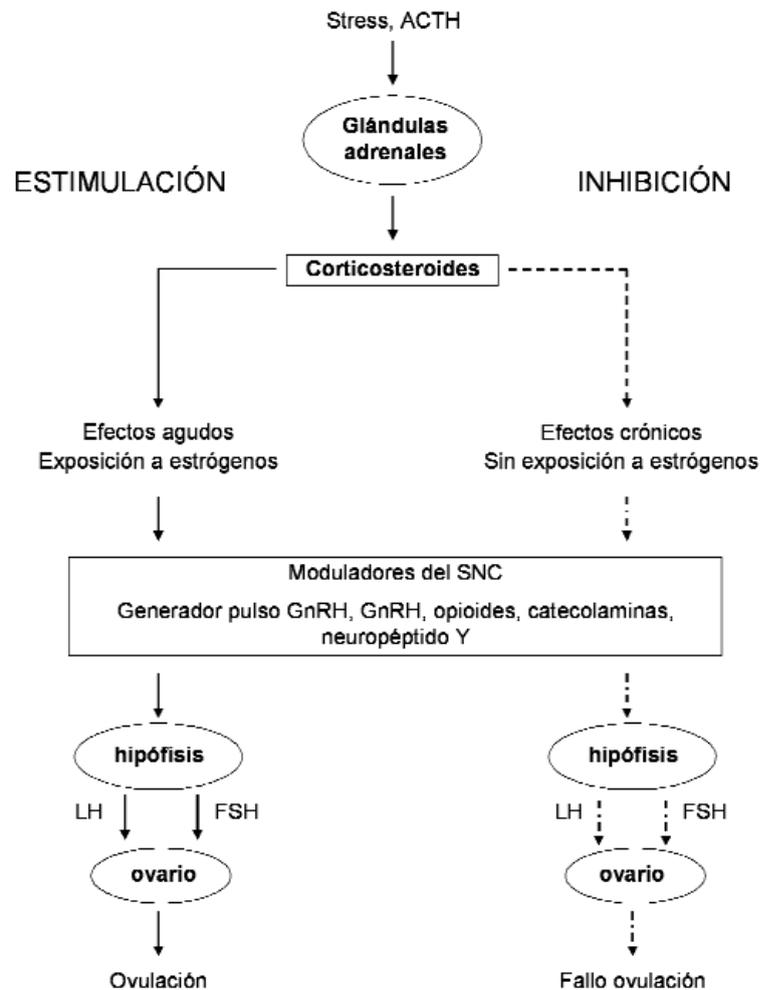


Figura 2: Efecto de la dexametasona (DEX) en la maduración nuclear de oocitos de ratón: barra gris, presencia de corpúsculo polar; barra blanca, disolución de la vesícula germinal "germinal vesicle breakdown"; barra negra, vesícula germinal (GV). Los datos están representados en porcentajes medios, n = 60. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre grupos (**P < 0.01, ***P < 0.001). Modificado de Van Merris et al. (2007).

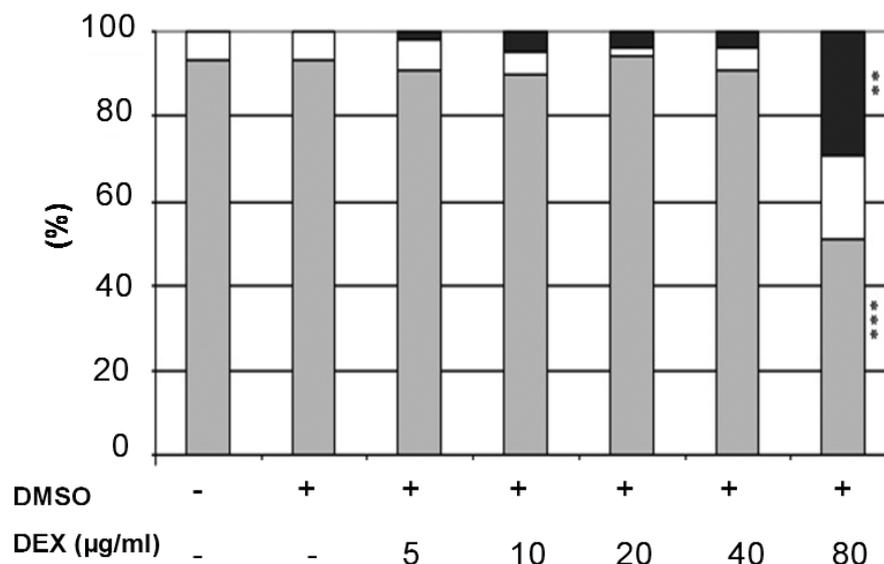


Figura 3: Evaluación del efecto de la dexametasona (DEX) en la formación de blastocistos y eclosión el día 6 de cultivo in vitro. Barra blanca, blastocistos no eclosionados. Barra gris: blastocistos parcialmente eclosionados. Barra negra: blastocistos con eclosión completa. El diagrama de barras representa el porcentaje medio de blastocistos, expresado como el número de blastocistos el día 6 de cultivo sobre el número de embriones de 2 células en el día 2 de cultivo; n = 60. La tasas medias de blastocistos señaladas con asteriscos representan diferencias estadísticas significativas (*P < 0.05, ***P < 0.001). Modificado de Van Merris et al. (2007).

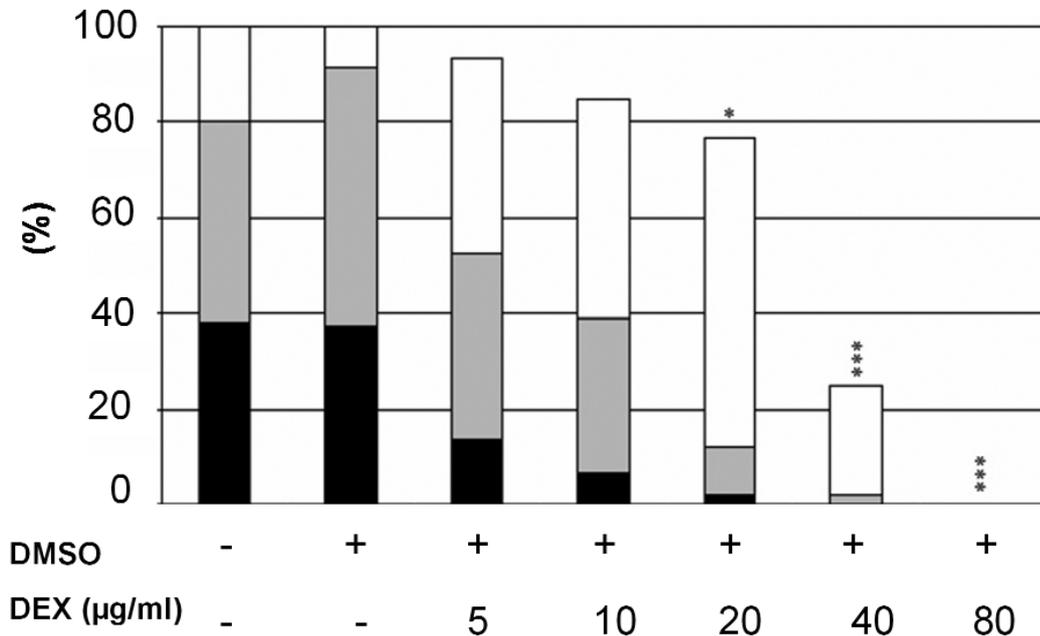
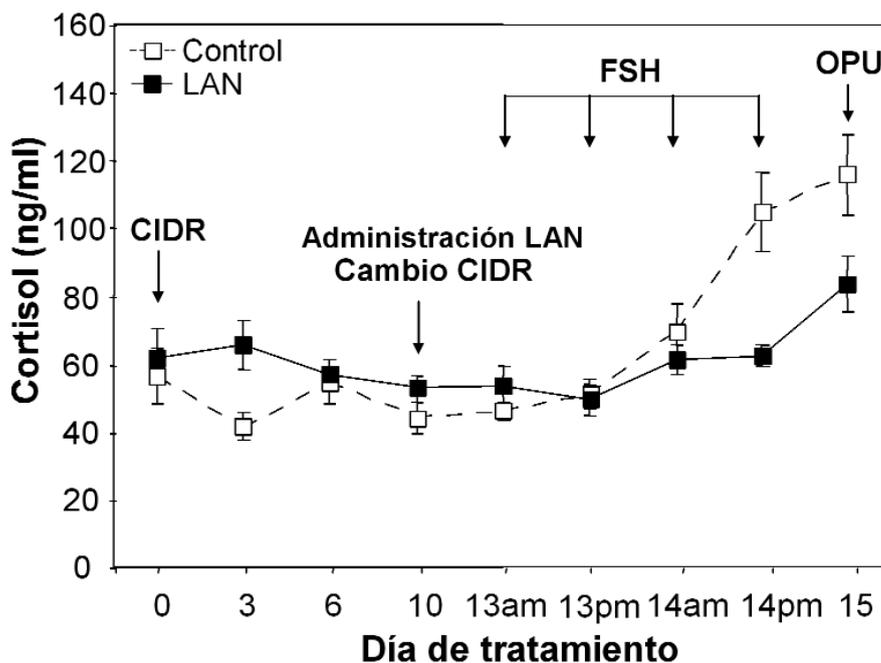


Figura 4: Niveles de cortisol plasmático en hembras de gacela Mohor (*Gazella dama mhorr*) durante la sincronización de celo y superovulación a las que se administró un tranquilizante de acción prolongada (LAN) o permanecieron sin tratamiento (controles). La sincronización de celos se realizó mediante la aplicación de un dispositivo intravaginal de liberación controlada de hormonas (CIDR) (Controlled internal drug release; 9% progesterona; CHIH Plastic Moulding, Hamilton, Nueva Zelanda) durante 15 días. Día 0: inserción del CIDR; día 10: recambio del CIDR y administración de enantato de perfenacina en el grupo LAN; días 13 y 14: administración de FSH; día 15: "ovum pick-up". Los resultados son medias ± E.S. Modificada de González et al. (2008).



REFERENCIAS

- Abrieu A, Doree M, Fisher D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science* 114:257-267.
- Adashi EY, Jones PB, Hsueh AJ. 1981. Synergistic effect of glucocorticoids on the stimulation of progesterone production by follicle stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 109:1888-1894.
- Andersen C. 2002. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *Journal of Endocrinology* 173:211-217.
- Andersen C. 2003. Effect of glucocorticoids on spontaneous and follicle-stimulating hormone induced oocyte maturation in mouse oocytes during culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85:423-427.
- Andersen CY, Hornnes P. 1994. Intrafollicular concentrations of free cortisol close to follicular rupture. *Human Reproduction* 9:1944-1949.
- Andersen C, Morineau G, Fukuda M, Westergaard LG, Ingerslev HJ, Fiet J, Byskov AG. 1999. Assessment of the follicular cortisol:cortisone ratio. *Human Reproduction* 14:1563-1568.
- Ben-Rafael Z, Benadiva CA, García CJ, Flickinger GL. 1988. Cortisol stimulation of estradiol and progesterone secretion by human granulosa cells is independent of follicle-stimulating hormone effects. *Fertility and Sterility* 49:813-816.
- Berga SL, Daniels TL, Giles DE. 1997. Women with functional hypothalamic amenorrhea but not other forms of anovulation display amplified cortisol concentrations. *Fertility and Sterility* 67:1024-1030.
- Berlinguer F, González R, Succu S, del Olmo A, Garde JJ, Espeso G, Gomendio M, Ledda S, Roldán ERS. 2008. In vitro oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Theriogenology* 69:349-359.
- Brann DW, Mahesh VB. 1991. Role of corticosteroids in female reproduction. *FASEB Journal* 5:2691-2698.
- Breen KM, Karsch FJ. 2006. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Frontiers in Neuroendocrinology* 27:233-245.
- Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development* 40:493-504.
- Chen WY, Yang JG, Li PS. 2000. Effect of dexamethasone on the expression of p34cdc2 and cyclin B1 in pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 56:74-79.
- Dobson H, Smith RF. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science* 60-61:743-752.
- Dobson H, Tebble JE, Smith RF, Ward WR. 2001. Is stress really all that important? *Theriogenology* 55:65-73.
- Dorn CG. 1995. Application of reproductive technologies in North American bison (*Bison bison*). *Theriogenology* 43:13-20.
- Facchinetti F, Matteo ML, Artini GP, Volpe A, Genazzani AR. 1997. An increased vulnerability to stress is associated with a poor outcome of in vitro fertilization embryo transfer treatment. *Fertility and Sterility* 67:309-314.
- Fateh M, Ben-Rafael Z, Benadiva CA, Mastroianni L, Flickinger GL. 1989. Cortisol levels in human follicular fluid. *Fertility and Sterility* 51:538-541.
- Ferin M. 2006. Stress and the reproductive system. In: Knobil and Neil's physiology of reproduction. Volume 2. Ed: Neill J. Third edition. Elsevier Academic Press. pp 2627-2696.
- Fernández-Arias A, Alabart JL, Echegoyen E, Folch J. 2000. Superovulation of tranquilized spanish ibex (*Capra pyrenaica*) females. *Theriogenology* 53:331. Abstract.
- González R, Berlinguer F, Espeso G, Ariu F, del Olmo A, Garde JJ, Gomendio M, Ledda S and Roldán ERS. 2008. Use of a neuroleptic in assisted reproduction of the critically endangered Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). En revisión
- Greeley MS, Calder DR, Taylor MH, Hols H, Wallace RA. 1986. Oocyte maturation in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*): Effects of steroids on germinal vesicle breakdown of intact follicles in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 62:281-289.
- Harlow CR, Jenkins JM, Winston RML. 1997. Increased follicular fluid total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. *Fertility and Sterility* 68:48-53.
- Hjollund NHI, Jensen TK, Bonde JPE, Henriksen TB, Andersson AM, Kolstad HA, Ernst E, Giwercman A, Skakkebaek NE, Olsen J. 1999. Distress and reduced fertility: A follow-up study of first-pregnancy planners. *Fertility and Sterility* 72:47-53.
- Huang TJ, Li PS. 2001. Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biology of Reproduction* 64:163-170.
- Hutchins MH, Thomas P and Asa CS. 1996. Pregnancy and parturition in captive mammals. In: Wild mammals in captivity. Eds: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S. Chicago: University of Chicago Press. pp 468-96.
- Keay SD, Harlow CR, Wood PJ, Jenkins JM, Cahill DJ. 2002. Higher cortisol:cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. *Human Reproduction* 17:2410-2414.
- Ledda S, Naitana S, Loi P, Dattena M, Gallus M, Branca A, Cappai P. 1995. Embryo recovery from superovulated mouflons (*Ovis gmelini musimon*) and viability after transfer into domestic sheep. *Animal Reproduction Science* 39:109-117.
- Lewicka S, von Hagens C, Hettinger U, Grunwald K, Vecsei P, Runnebaum B, Rabe T. 2003. Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Human Reproduction* 18:1613-1617.
- Matteri RL, Carroll JA, Dyer CJ. 2000. Neurocrine responses to stress. In: The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Eds: Moberg GP, Mench JA. Wallingford, UK. CABI Publishing. pp 43-76.
- McEwen BS, Wingfield JC. 2003. The concept

of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* 43:2-15.

Michael AE. 2003. Life after liquorice: the link between cortisol and conception. *Reproductive BioMedicine Online* 7:77-84.

Michael AE, Pester LA, Curtlis P, Shaw RW, Edwards CRW, Cooke BA. 1993. Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clinical Endocrinology* 38:641-644.

Michael AE, Thurston LM, Rae MT. 2003. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction* 126:425-441.

Omura K, Morohashi K. 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 53:19-25.

Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53:163-174.

Ptak G, Clinton M, Barboni B, Muzzeddu M, Cappai P, Tischner M, Loi P. 2002. Preservation of the wild European mouflon: The first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biology of Reproduction* 66:796-801.

Pugeat MM, Dunn JF, Nisula BC. 1981. Transport of steroid hormones: Interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53:69-75.

Pukazhenti BS, Wildt DE. 2004. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reproduction Fertility and Development* 16:33-46.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21:55-89.

Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. 1982. Rat ovary glucocorticoid receptor: Identification and characterization. *Steroids* 39:569-584.

Schoonmaker JN, Erickson, GF. 1983. Glucocorticoid modulation of follicle-stimulating hormone-mediated granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 113:1356-136

Smeenk JMJ, Verhaak CM, Vingerhoets AJJM, Sweep CGJ, Merkus JMWM, Willemsen SJ, van Minnen A, Straatman H, Braat DDM. 2005. Stress and outcome success in IVF: the role of self-reports and endocrine variables. *Human Reproduction* 20:991-996.

Sunak N, Green DF, Abeydeera LR, Thurston LM, Michael AE. 2007. Implication of cortisol and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction* 133:1149-1158.

Swaisgood RR, Owen MA, Czekala NM, Mauroo N, Hawk K and Tang JCL. 2006. Evaluating stress and well-being in the giant panda: a system for monitoring. In *Giant pandas. Biology, veterinary medicine and management*. Ed: Wildt DE, Zhang A, Zhang H, Janssen DL and Ellis S. Cambridge University Press. pp 299-314.

Tetsuka M, Milne M, Simpson GE, Hillier SG. 1999. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biology of Reproduction* 60:330-335.

Thurston LM, Norgate DP, Jonas KC, Gregory L, Wood PJ, Cooke BA, Michael AE. 2003. Ovarian modulators of type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) activity and intra-follicular cortisol:cortisone ratios correlate with the clinical outcome of IVF. *Human Reproduction* 18:1603-1612.

Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction* 5:105-113.

Van Merris V, Van Wemmel K, Cortvrindt R. 2007. In vitro effects of dexamethasone on mouse ovarian function and pre-implantation embryo development. *Reproductive Toxicology* 23:32-41.

Vermeulen A. 2000. Stress and reproduction. In: *Endocrine basis of reproductive function*. Ed: Fillicori M. Bologna, Italy. Monduzzi Editore. pp 77-99.

Webb R and Michael AE. 2006. 11 β HSD activities in porcine oocytes and cumulus-oocyte complexes. Society for Reproduction and Fertility Conference and National Ovarian Workshop. University of Leeds, 3-5 July. N05 Abstract.

Yang JG, Chen WY, Li PS. 1999. Effects of glucocorticoids on maturation of pig oocytes and their subsequent fertilizing capacity in vitro. *Biology of Reproduction* 60:929-936.

Zhang GQ, Swaisgood RR, Zhang HM. 2004. Evaluation of behavioral factors influencing reproductive success and failure in captive giant pandas. *Zoo Biology* 23:15-31.

COMPROMETIDOS CON LA INNOVACIÓN EN DGP

REALIZAMOS

Test de aneuploidías
Reorganizaciones cromosómicas y
enfermedades monogénicas

OFRECEMOS

Programación inmediata
Alta experiencia
Continúa innovación tecnológica

EXPERIENCIA

>12.000 ciclos (Enero 2008)



REPROGENETICS

DIRECTORES CIENTÍFICOS

USA Santiago Munné - Jacques Cohen

SPAIN Mireia Sandalinas - Carles Giménez

UK Dagan Wells

www.reprogeneticsspain.com

NUEVA JUNTA DIRECTIVA DE ASEBIR

Presidente: Mark Grossmann i Camps.

Vicepresidenta: M^a Victoria Hurtado de Mendoza.

Secretaría: Nieves Cremades Fernández
Tesorero: Manuel Ardoy Vilches

Vocalía de Docencia y Formación: Jorge Martín Cuadros Fernández, Montserrat Boada Palá.

Vocalía del Sitio Web: Jorge Ten Morro, Fernando Marina Rugero.

Vocalía de Publicaciones: María Bonada Sanjaume, Antonio Urries López.

Vocalía de Congresos: M^a José de los Santos Molina, Begoña Arán Corbella, Nieves Cremades Fernández.

Vocalía de Relaciones Públicas: Fernando Marina Rugero, Jorge Ten Morro.

RELEVO EN EL COMITÉ ASESOR DE ESHRE

La Dra. Mtserrat Boada Palà fue designada representante española de embriología en el Advisory Committee de ESHRE en sustitución del Dr. Mark Grossmann i Camps que finalizó su etapa (2002-2007) como miembro asesor. Cada país tiene dos representantes en este comité y el que corresponde a los clínicos españoles deberá decidirse mediante votación ya que se han presentado dos candidatos.

REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN DEL PROGRAMA DE FORMACIÓN EN EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Tras un intenso y concienzudo trabajo, los Drs. Carmen Ochoa Marieta, Antonio González Útor y Manuel Ardoy Vilches ha finalizado la revisión del programa de formación en embriología clínica que ASEBIR propone. La nueva versión estará disponible para consulta en la sección restringida de la página web de ASEBIR, dicha versión será la que presentaremos en el Ministerio de Sanidad y Consumo en nuestro empeño de conseguir la especialidad en embriología clínica. Desde la Junta Directiva queremos agradecer públicamente a los tres consocios el enorme esfuerzo realizado y queremos destacar la consistencia y ambición de los contenidos propuestos.

CARTA DE LA PRESIDENTA DEL IV CONGRESO ASEBIR BILBAO 2007

Como todos os acordareis, el IV Congreso Nacional de ASEBIR, tuvo lugar en Bilbao del 21 al 23 de Noviembre de 2007. El Congreso fue declarado de interés sanitario por la consejería de sanidad del Gobierno Vasco / Eusko Jaurlaritza . Y por primera vez se concedieron 2,2 puntos de crédito, para todos los asistentes que cumplieran con los requisitos establecidos por el comité

evaluador del consejo vasco de formación continuada de las profesiones sanitarias. Estos créditos han sido ya gestionados por nuestra secretaría técnica y enviados los diplomas acreditativos a aquellos congresistas que en su momento lo solicitaron.

El programa científico incluyó 19 ponencias, con profesores nacionales e internacionales, un aula virtual, una sección de debate, 34 comunicaciones orales y 121 pósteres. Además de dos interesantes Simposiums satélite, durante los espacios posteriores a los almuerzos.

La asistencia y participación ha sido excelente. Un total de 373 personas acudieron a esta convocatoria y se recibieron 158 resúmenes de comunicaciones, que fueron evaluadas por el comité científico con gran diligencia.

El congreso ha supuesto un impacto mediático en diferentes medios (prensa escrita, hablada, TV, radio...). Durante dos días y medio se habló de la embriología clínica y de ASEBIR. Y se consiguió, que también se hicieran eco de esto en el Ministerio de Sanidad y Consumo.

La industria ha valorado nuestro congreso como un evento con importante poder de convocatoria en nuestro sector, por lo que ha cambiado su perspectiva y sus deseos de colaboración para futuros eventos.

El apoyo de nuestra sociedad a los investigadores básicos de nuestro país ha quedado plasmado con la creación de un nuevo premio ASEBIR-EMB. El premio dotado con 2500 euros y patrocinado por el grupo EMB fue entregado, por primera vez, a la mejor comunicación de investigación básica, por el presidente

de ASEBIR Sr. Mark Grossman y por el Sr. Sergio Oliveró, director general del grupo EMB. Manteniéndose, también el premio a la mejor comunicación en embriología clínica con la misma cuantía y patrocinio.



Carmen Ochoa y Mark Grossmann durante la clausura del IV Congreso Nacional ASEBIR

La calidad científica y el rigor de los trabajos presentados ha motivado una excelente imagen del colectivo de profesionales que nos dedicamos a la embriología en España, impresión que nos han transmitido los asistentes internacionales, y que suponen la mejor carta de presentación de nuestro colectivo en Europa.

El espíritu crítico y colaborador de todos los que asistieron nos ha dejado un importante número de sugerencias tanto en aspectos científicos como organizativos. Sugerencias que ya hemos transmitido al comité organizador del V Congreso y a su presidenta.

Para finalizar felicitamos a todos los asistentes por vuestra participación y convocaros para el V Congreso Nacional de ASEBIR, que tendrá lugar en Valencia en 2009.

Carmen Ochoa

Senior Clinical Embryologist en proceso de acreditación de la ESHRE



(Fotografía cortesía de Joan Sarquella (GiroFiv) extraída de la representación teatral “El científico loco” en la que nuestro compañero “clava” su papel)

Jul 6-9 24

Annual Meeting of the ESHRE

<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=286>

Barcelona Spain

Ag 27-29

9th International Congress on Reproductive Biomedicine and

4th International Congress on Stem Cells Biotechnology

<http://www.royaninstitute.org/congress/>

Tehran Iran

Sept 1-5

III Workshop de Biopsia Embrionaria y Fijación de Blastómeros. CME

<http://www.centromedicinaembrionaria.com/profesionales/cursos.html>

Madrid Spain

Sept 11-13

7th Athens Congress on Women's Health & Disease - Gynecologic, Obstetrics and
Reproductive Issues

<http://www.womenshealth2008.org>

Athens Greece

Sept 12-14

International Symposium on preventive ART fertility preservation & preimplantation diagnosis

http://www.cretesymposium2008.mdcongress.gr/index_19.asp?

Chania, Crete Greece

Jun 13-16

LXXIII Congreso Nacional de Urología.

http://www.aeu.es/aeu_webs/congreso/

Barcelona Spain

Sept 19-20

Basic principles in ovarian physiology: Relevance for IVF

ESHRE Campus workshop

Organized under the auspices of the Special Interest Group Reproductive Endocrinology

<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=1055>

Lisbon, Portugal

Oct 6-7

The menopause and its management: a revisit

ESHRE Campus Meeting

Organised by the ESHRE Special Interest Group Reproductive Endocrinology

and the ESHRE Special Interest Group Endometriosis/Endometrium

<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=1031>

Edinburgh UK

Oct 20-22

The Fertility Society of Australia Annual Scientific Meeting 2008

<http://www.fsa.au.com/apps/events/event.php?EventsID=98>

Hilton Hotel

Brisbane

Nov 8-12

64th Annual Meeting of the ASRM

<http://www.asrm.org/Professionals/Meetings/annualmeeting.html>

San Francisco USA

Nov 14-15

Cancer and fertility

ESHRE Campus Meeting

Organised by the ESHRE Task Force on "Fertility preservation in severe diseases"

in co-operation with the National Centre for Tumour Diseases (NCT), Heidelberg

<http://www.eshre.com/emc.asp?pageId=1032>

Heidelberg Germany

Nov 20-21

International workshop on Infertility and Assisted reproduction

<http://gyneco-obstetrique.hug-ge.ch/enseignement.html>

Geneva Switzerland

Nov 26-28

5th European Congress of Andrology

[http://www.andrology2008.com./](http://www.andrology2008.com/)

Rome Italy

Nov 26-29

Tecnobios Procreazione Symposium 2008 and

3rd International Conference on the Cryopreservation of the Human Oocyte

<http://www.tecnobiosprocreazione.it/en/conferences/tecnobios-symposiumm-congress-2008.html>

Bologna Italy

Nov 26-29

54th Annual Meeting of the Canadian Fertility and Andrology Society

<http://cfas.cfwebtools.com/index.cfm?objectid=20444324-F849-D5A7-E2319DB21E8008F1>

Calgary Canada

Nov 28-29

Curso Internacional Controversias en Ginecología y Reproducción. Hospital La Fe.

Valencia Spain

Nov 27-30

Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI)

<http://www.comtecmed.com/cogi/paris/>

Paris France

INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES - NORMAS DE PUBLICACIÓN

NORMAS DE PUBLICACIÓN

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

La revista ASEBIR se publica semestralmente por lo que es indispensable que los escritos para las secciones de Debates, Noticias y Agenda sean enviados antes del 30 de Abril para el primer número del año (Junio) y antes del 15 de Noviembre para el segundo número del año (Diciembre).

Los originales deben enviarse a:

Secretaría de ASEBIR, C/ Cronos 20, Edificio 4, 1º Piso, 6ª. 28037 (Madrid). Se recomienda utilizar sobres que protejan adecuadamente el contenido informático.

Manuscritos: Todos los trabajos remitidos deberán ser inéditos y se presentarán en un manuscrito original y dos copias impresas, a doble espacio en hojas din A4, así como también en soporte informático. Se acompañarán de una carta de presentación en la que se solicite su valoración y se indique la sección donde se desea su publicación. En esta carta debe constar claramente que el trabajo no ha sido publicado previamente y que todos los autores están de acuerdo en su contenido y ceden los derechos de su publicación a ASEBIR. Para la reproducción de material ya editado es necesaria la autorización expresa de los propietarios del copyright.

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

En la primera página de todos los trabajos se indicará, en el siguiente orden: título en castellano; título en inglés; nombre y un apellido de cada uno de los autores y nombre completo del centro, con la dirección para correspondencia, incluido correo electrónico. En la segunda página se incluirá un resumen y las palabras clave (ambos en castellano e inglés). La estructura de los manuscritos preferentemente deberá organizarse en los apartados de Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Bibliografía, Tablas y Gráficas. Las tablas se numerarán con números romanos y las figuras con números arábigos. Los pies de figura se imprimirán en hoja aparte y cada figura llevará escrito en el dorso su numeración.

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

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

A) Artículo de revista con menos de 6 autores:

Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic

individuals using computer-assisted analysis. Fertil Steril 1993;59:418-423.

B) Artículo de revista con más de 6 autores:

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

C) Libro completo:

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

D) Capítulo de libro:

Siracusa G, Felici M, Salustri A.

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

E) Comunicación a congreso:

Bengston S, Solheim. Hatching assisted. XXII Meeting of European Society of Human Reproduction and Embriology; 1997 Jun20-23; Roma, Italia. p. 1561-2.

Para la sección de debate se aceptarán textos (de no más de dos hojas din A4 a 30 líneas, incluidas un máximo de cinco citas bibliográficas y dos figuras si las hubiere), que reflejen la opinión de

los diferentes firmantes sobre el tema de discusión que se propondrá en el número de la revista anterior.

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

BOLETÍN DE INSCRIPCIÓN

DATOS PERSONALES:

D./Dña.:

Domicilio:

Ciudad:

E-mail:

Formación básica (Médico, Biólogo, Farmacéutico, etc...):

Grado académico (Licenciado, Doctor, Especialista en ..., etc.):

Teléfono:

C.P.:

Móvil:

CENTRO DE TRABAJO:

Domicilio profesional

Calle:

Centro de trabajo:

Ciudad:

E-mail:

Departamento:

Teléfono.:

C.P.:

Fax.:

¿Desea pertenecer como miembro numerario a la asociación para el estudio de la biología de la reproducción, ASEBIR?

DATOS BANCARIOS:

Banco/Caja:

Agencia:

Nº de cuenta:

Provincia:

Desea recibir la correspondencia en:

Dirección particular

Dirección de trabajo

FIRMA

FECHA

Enviar a: Secretaría ASEBIR C/Cronos Nº20 Bloque 4, Planta 1ª, Nº6, 28037 Madrid.

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

Sr. Director de la Agencia Nº:

C/

Ruego a Ud. se sirva cargar en:

Nº de cuenta:

Banco/Caja:

Provincia:

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

FIRMA

FECHA

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

