

REVISTA

# ASEBIR

V Congreso  
Valencia '09

→ 25, 26 Y 27 DE NOVIEMBRE  
Palacio de Congresos



#### ACTUALIDAD

La importancia de una buena práctica en "PGS".

#### ARTÍCULOS

Estudio Genético Preimplantacional en pacientes portadores de translocación Robertsoniana (13;14).

Las apariencias a veces engañan, la verdadera belleza está en el interior.

Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen.

#### DEBATE

"Turismo reproductivo", NO. "Flujo de pacientes", SI.

Reproductive Tourism.

Flujo de pacientes entre países. ¿qué sabemos de ello?

#### V CONGRESO NACIONAL DE ASEBIR PROGRAMA CIENTIFICO

#### FORMACIÓN CONTINUADA

Papel de los factores solubles en foliculogénesis.

#### CALENDARIO

#### NOTICIAS

#### 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 Vitricación

## Embriones desvitrificados: división en día +4

PACIENTE 1



PACIENTE 2



\*\* Imágenes cedidas por CREA (Valencia)



PROCESO	MEDIOS	MEDIOS CON PROTEÍNA	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	Tyrode's	Embryo Biopsy Medium	

SSM: SINGLE STEP MEDIUM

# ASEBIR

## SUMARIO

### SUMARIO

Pág.

#### EDITORIAL

3

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

#### ACTUALIDAD

4

La importancia de una buena práctica en "PGS".  
Esther Fernández García

#### ARTÍCULOS

7

Estudio Genético Preimplantacional en pacientes portadores de translocación Robertsoniana (13;14).  
Hebles, M.; Dorado, M.; Migueles, B.; González, M; Aguilera, L.; Núñez, G.; Lara, J.; Rodríguez, A.; Sánchez, F. y Sánchez, P.

Las apariencias a veces engañan, la verdadera belleza está en el interior.  
Olmedo Illueca, C.; Lozano Zamora, M.; Iñiguez Tornero, J. y Cuevas Sáiz, I.

Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen.  
Fernández, A.; Gonzalvo, C.; Clavero, A.; Ruiz de Assín, R.; Zamora, S.; Roldán, M.; Rabelo, B.; Ramírez, J.P.; Yoldi, A.; Castilla, J.A."

#### DEBATE

28

"Turismo reproductivo", NO. "Flujo de pacientes", SI.  
Xavier Orríols y Montse Boada. Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

Reproductive Tourism.  
Bonnie Collins. Laboratory Manager. Centre for Reproductive Medicine, St Bart's Hospital. London.

Flujo de pacientes entre países. ¿qué sabemos de ello?  
Marta Tresanchez y Montserrat Boada. Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

#### V CONGRESO NACIONAL DE ASEBIR. PROGRAMA CIENTIFICO PRELIMINAR

32

#### FORMACIÓN CONTINUADA

37

Papel de los factores solubles en foliculogénesis.  
Paloma Sánchez-Aparicio, Sierra Muñoz-García, Jorge Cuadros

#### CALENDARIO

44

#### NOTICIAS

46

#### BOLETÍN DE INSCRIPCIÓN

49

Junio 2009 Vol. 14 • N°1

#### EDITA

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

#### JUNTA DIRECTIVA

Presidente: Mark Grossmann i Camps.

Vicepresidenta: M<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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 · Torrelodones · Madrid  
Tfno - Fax.: 91 859 57 22  
www.gobalo.es · info@gobalo.es

Depósito legal: M-18873-1996

ISSN: 1136-4424

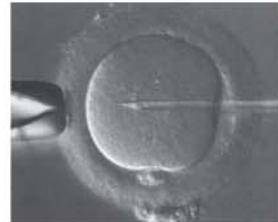
Soporte válido: 78-R-CM

**CONTROLTECNICA**

**instruments**

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

Incubadores CO<sub>2</sub>, Cabinas de flujo laminar, Centrífugas, Autoclaves, Balanzas, Agitadores, ... Mobiliario técnico de laboratorio



**Instrumentación para ciencias de la vida**



**Controltecnica Instrumentación Científica S.L**  
C/ Artesanos, 7 (Prado del espino) 28660 Boadilla  
Tel. 91 728 08 10 **Distribuidores a nivel Nacional**  
E-mail: [lab@controltecnica.com](mailto:lab@controltecnica.com)

**CONTROLTECNICA**

**instruments**

## APUESTA POR LA FORMACIÓN CONTINUADA

### QUERIDAS/OS COLEGAS:

Está escrito en los estatutos de nuestra asociación, está reflejado en las intervenciones de los socios durante las asambleas ordinarias y está presente en nuestra mente como una prioridad de esta Junta Directiva: potenciar la formación.

Y ¿cómo lo hacemos? Bien, pues trabajando duro en cuatro frentes:

Cuadernos ASEBIR de Embriología Clínica. Gracias al trabajo de los grupos de interés hemos revisado los dos cuadernos que ya teníamos publicados, de manera que ahora están actualizados y disponibles en formato digital desde la zona restringida de nuestra Web. Quedarnos aquí sería quedarse corto, a medias, y por ello nos proponemos exprimir más nuestras energías y publicar otros dos cuadernos en los próximos meses, y conseguir que la colección de Cuadernos ASEBIR sea una herramienta de consulta imprescindible para los embriólogos.

Jornadas de Formación ASEBIR sobre Reproducción Asistida. Por primera vez nuestra asociación ha organizado una actividad formativa completamente desvinculada del congreso. En esta ocasión escogimos adrede dirigirnos a los embriólogos júnior y ofrecer conocimientos básicos en andrología, embriología y legislación, en una única jornada que se repitió en Barcelona, Madrid y Sevilla, con lleno "hasta la bandera".

Para nosotros es un placer (y también un orgullo) comunicaros que esta actividad formativa fue un éxito en las tres sedes, y que como efecto colateral nos proporcionó un considerable número de nuevos socios/as en el colectivo de estudiantes y recién licenciados. Asimismo, mediante las encuestas de satisfacción realizadas a los asistentes, hemos constatado el estado tan saludable de ASEBIR joven ya que hay un gran interés porque las Jornadas se repitan, tengan una mayor duración y se han propuesto numerosos temas de interés a desarrollar en próximas ediciones.

A parte de estas Jornadas propias, ASEBIR y SEF han auspiciado e intervenido en una Jornada de controversias sobre DGP celebrada en Málaga, el pasado 8 de Mayo, ya que la formación no es una exclusiva nuestra, obviamente.

Artículos de Formación Continuada en la Revista. Igualmente satisfechos estamos de la calidad de los artículos que se publican en la sección FC. La actividad decana en formación dentro de ASEBIR cumple con creces su función y nos aporta novísimos conocimientos en cada entrega gracias a la selección de autores que realiza la vocalía de Formación. Por ello queremos crear un espacio en nuestra web para agrupar los últimos artículos de Formación Continuada publicados en la revista.

Congreso. El propio congreso es, por definición, una actividad formativa de primer orden. Y en el entorno del próximo congreso ASEBIR (¿tenéis ya la inscripción hecha, verdad?) esperamos que el grupo de interés en Diagnóstico Genético Preimplantacional desarrolle el primer taller formativo sobre técnicas de biopsia y fijación. De hecho, los grupos de interés son el alma mater de la actividad asociativa y por lo que al DGP se refiere, en la sección Actualidad de este mismo número de la revista podréis leer su opinión sobre el recientemente instaurado debate a favor/en contra del screening de aneuploidías (PGS).

Todo este trabajo no sería posible, antes lo hemos dicho y ahora lo repetimos, sin el esfuerzo desinteresado de los miembros de los grupos de interés, también los autores que nos han brindado su tiempo y sus conocimientos, de los ponentes que se prepararon las charlas y la participación de nuestros patrocinadores que, a pesar de estar inmersos en un año de crisis, nos han mantenido su apoyo. A todos ellos muchas gracias.

¿Y qué más? Consideramos que nuestra formación ha de ser integral, no limitarse a lo puramente técnico, hemos de conocer el por qué, cómo, cuándo, de qué forma y qué trascendencia tienen nuestros actos. Si os fijáis, buena parte de esta actividad formativa que estamos desarrollando está centrada en la embriología clínica. Eso es bueno, pero no debemos olvidar nuestro alter ego y somos conscientes que la formación básica en biología de la reproducción y en bioética son áreas en las que deberíamos adentrarnos en proyectos futuros.

La revista y los boletines digitales ofrecerán información del desarrollo de todos estos proyectos, pero es en la página web dónde encontraréis todos los detalles actualizados. Estamos reformando este espacio digital: esperamos que os sea agradable y útil, y os animamos a usar el foro como lugar virtual de consulta y debate.

Atentamente,  
**Mark Grossmann i Camps**  
 Presidente



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



## LA IMPORTANCIA DE UNA BUENA PRÁCTICA EN "PGS"

*"El diagnóstico genético preimplantacional no hace que el embrión sea mejor"*

*(Don Leigh, 9th Internacional Conference on Preimplantation Genetics, Miami 2009)*

Esther Fernández García, Carles Gimenez i Sevilla, Mónica Parriego i Beltran, Carmen Rubio Lluosa, Lorena Rodrigo Vivo, Xavier Vendrell Montón, Esther Velilla i Garcia. Grupo de Interés de DGP-ASEBIR

### GRUPO DE INTERÉS DE DGP-ASEBIR

En estos últimos meses, todos hemos asistido a la crítica feroz a que ha sido sometida la técnica de DGP para el despistaje de aneuploidías que frecuentemente vemos referenciado como PGS (del inglés, preimplantation genetic screening). Han sido varios los artículos que han querido poner de manifiesto la "no utilidad" de esta técnica en el campo de la reproducción humana. Lo más llamativo no ha sido la publicación casi al unísono de estos artículos, sino la buena aceptación que han tenido por parte de los profesionales de la Reproducción, sin profundizar en el diseño, la metodología o los resultados clínicos de los mismos. Estas técnicas, asociadas a la FIV, que llevan practicándose durante más de 15 años, en unos meses han sido desechadas sin contemplaciones.

Como no podía ser de otro modo, desde el Grupo de Interés en DGP de ASEBIR hemos revisado estos estudios en los que se concluía que la selección de embriones cromosómicamente normales, para un número cromosomas, no mejoraba las tasas de embarazo por ciclo para las indicaciones de edad materna avanzada, fallo repetido de implantación o en pacientes de buen pronóstico de FIV.

Debido a la trascendencia que han tenido estas afirmaciones para aquellos que practicamos la medicina reproductiva, nuestro primer planteamiento fue responder de una manera constructiva mediante una carta al editor, que en estos momentos está aceptada para su publicación (HUMAN REPRODUCTION, 2009), en la que hacemos hincapié en la importancia que "una buena práctica" puede tener en los resultados finales del PGS.

Dentro de la metodología utilizada en los estudios prospectivos randomizados publicados encontramos tres aspectos básicos que merecen una revisión crítica:

- el análisis genético realizado: en algunos de los trabajos publicados encontramos una elevada incidencia de embriones no-informativos o sin diagnóstico, en concreto en el trabajo de Mastenbroek y colaboradores (2007) este porcentaje se eleva al 20% y sólo en un 50% de las pacientes del grupo de "PGS" se transfieren únicamente embriones informativos para los cromosomas analizados, por lo que el posible beneficio de la técnica se ve enmascarado por la transferencia de embriones sin diagnóstico. Por otro lado, en estos trabajos también se observa la ausencia de cromosomas muy relevantes como el cromosoma 15 y 22, que aparecen frecuentemente implicados en las aneuploidías observadas en abortos espontáneos. La ausencia de análisis de estos cromosomas disminuye la detección de aneuploidías del 85% al 27%. Además, para obtener un diagnóstico lo más preciso posible, los grupos con mayor experiencia recomiendan rehibridar con sondas subteloméricas, que marcan otra región del cromosoma, aquellos blastómeros con monosomías o señales dudosas, permitiendo diferenciar una monosomía real de un solapamiento de dos cromosomas homólogos, consiguiendo un diagnóstico de aquellas señales dudosas. Mediante estas rehibridaciones se aumenta la eficiencia y la precisión de la técnica.

- la biopsia, la fijación y cultivo embrionario posterior: un aspecto imprescindible para la aplicación del "PGS" es disponer de un laboratorio de FIV en que esté optimizado el cultivo prolongado de embriones, ya que en el

DGP de forma frecuente la transferencia se realiza en estadio de blastocisto, tras obtener los resultados del análisis genético. Recientemente se ha publicado un trabajo (Beyer et al., 2009) en el que se describe la notable mejora en los resultados de "PGS" en mujeres de edad avanzada, con el cambio de las condiciones de cultivo en el laboratorio. Por otro lado, la técnica de biopsia embrionaria debe aplicarse por manos expertas para que la manipulación del embrión tenga un efecto mínimo en su viabilidad y posterior capacidad de implantación. Como ejemplo de lo que no puede ocurrir, tenemos el trabajo publicado por Mastenbroek y colaboradores en 2007, donde se puede observar una disminución en la tasa de implantación de los embriones biopsiados respecto a los controles del 50%. La fijación del núcleo de la célula biopsiada también es crucial para el PGS mediante FISH, pues una fijación deficiente puede dar lugar a un incremento de fallos de hibridación (quedando así núcleos, y por tanto embriones, sin diagnóstico) y a un mayor solapamiento de señales, incrementando así el número de falsas monosomías, e introduciendo posibles errores diagnósticos.

- y por último consideramos muy importantes los criterios de inclusión de pacientes en los diferentes estudios: este aspecto llama sobre todo la atención en los trabajos de edad materna avanzada donde hay autores que ya engloban bajo esta etiqueta a mujeres  $\geq 35$  años (Mastenbroek et al., 2007; Schoolcraft et al., 2008). Consideramos que este límite habría que establecerlo a partir de los 40 años, edad a partir de la cual una FIV convencional ofrece tasas de embarazo más bajas con mayor riesgo de aborto y de descendencia aneuploide. Sobre este

último aspecto, se pasan por alto en estos trabajos las interrupciones voluntarias de embarazo que se realizaron en pacientes con gestaciones aneuploides en las que no se había realizado "PGS" así como la actitud de las pacientes ante una gestación anormal. En dos trabajos recientes se ha publicado que el 84% de las pacientes de riesgo encuestadas se inclinaban hacia el "PGS" para prevenir futuras gestaciones con Síndrome de Down (Twisk et al., 2007; Shahine et al., 2007). Finalmente, si el DGP no es necesario, ¿por qué llevarlo a cabo en pacientes con buen pronóstico de FIV? (Staessen et al. 2008, Jansen et al. 2008).

Con todo ello nos gustaría invitaros a releer los estudios prospectivos randomizados publicados sobre "PGS" con una visión crítica del diseño y de la metodología empleada y animaros a valorar la importancia de la experiencia

y de la buena práctica en el éxito de esta técnica.

## REFERENCIAS

- Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, Haentjens P, Van der Elst J, Devroey P. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 848-54.

- Beyer CE, Osianlis T, Boekel K, Osborne E, Rombauts L, Catt J, Kravetski V, Aali BS, Gras L. Preimplantation genetic screening outcomes are associated with culture conditions. *Hum Reprod.* 2009, Jan 30. [Epub ahead of print].

- Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, Meuleman C, Frijns JP, Vermeesch JR, D'Hooghe TM. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35years:

a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2009 Feb 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19249029.

- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, Reismer E, Borg K, Wikland M, Bergh C. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008; 23: 2806-12.

- Jansen RP, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB, McArthur SJ. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod* 2008; 23: 1476-8.

- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, Vogel NE, Arts EG, de Vries JW, Bossuyt PM, Buys CH, Heineman MJ, Repping S, van der Veen F. In vitro fertilization with

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

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



**MediCult España S.L.**

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

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

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



**MediCult**

Innovation with Care

Esther Fernández García et al. La importancia de una buena práctica en "PGS"

6

preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007; 357: 9-17.

- Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2008; 90: 287-9.

- Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the "good prognosis" patient. *Fertil Steril* 2008; Sep 17.

- Rubio C, Giménez C, Fernández E, Vendrell X, Velilla E, Parriego M, Rodrigo L. The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. *Hum Reprod* 2009, In press.

- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation

aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2008; Aug 8. [Epub ahead of print]

- Shahine LK, Kuppermann M, Davis G, Creasman J, Cedars MI. Patient willingness to participate in a clinical trial with preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2008; 89: 879-84.

- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004; 19: 2849-58.

- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in

women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008; 23:2818-25.

- Twisk M, Haadsma ML, van der Veen F, Repping S, Mastenbroek S, Heineman MJ, Bossuyt PM, Korevaar JC. Preimplantation genetic screening as an alternative to prenatal testing for Down syndrome: preferences of women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment. *Fertil Steril* 2007; 88: 804-10. *Fertil Steril* 2008; 90:1287-9.

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 aneuploidias  
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**

# ESTUDIO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN PACIENTES PORTADORES DE TRANSLOCACIÓN ROBERTSONIANA (13;14)

## PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS OF ROBERTSONIAN TRASLOCATION CARRIERS

Hebles, M.; Dorado, M.; Migueles, B.; González, M.; Aguilera, L.; Núñez, G.; Lara, J.; Rodríguez, A.; Sánchez, F. y Sánchez, P.  
Clínica Ginemed. C/ Farmacéutico Murillo Herrera, nº 3. 41010 . Sevilla  
Correo electrónico: mhebles@ginemed.es

### RESUMEN

En pacientes portadores de translocaciones Robertsonianas (13;14) se observa una mayor tasa de abortos. El análisis cromosómico de los espermatozoides por FISH en estos pacientes, describe la proporción de espermatozoides normales que nos podemos encontrar en el eyaculado de los mismos. Esta proporción se ajusta al número de pre-embriónes normales que se obtienen en estas parejas tras someterlas a un ciclo de Fecundación in Vitro y posterior diagnóstico genético preimplantacional.

El objetivo del presente trabajo es establecer la relación entre el análisis cromosómico de los espermatozoides por FISH y la tasa de pre-embriónes genéticamente normales en pacientes portadores de una traslocación Robertsoniana (13;14).

### SUMMARY

There is a higher miscarriage rate in patients with robertsonian translocations. The chromosomal analysis by FISH in the spermatozoa of these patients describes the percentage of normal spermatozoa that we can find in the ejaculate. From the relevant literature it has been shown that this proportion is comparable to the rate of normal embryos that can be found in a preimplantation genetic diagnosis IVF cycle.

The aim of this study is to determine the correlation between the chromosomal analysis of spermatozoa by FISH and the percentage of chromosomically normal embryos analysed by PGD in an IVF cycle in patients with Robertsonian translocations.

### INTRODUCCION

Las translocaciones estructurales cromosómicas son comunes en la población humana (Nielsen and Wohlert, 1991). Dentro de las translocaciones estructurales, las más frecuente son las translocaciones Robertsonianas, con una frecuencia de 1 caso cada 1000 nacidos (Gardner and Sutherland, 1996). Esta proporción se ve aumentada en el caso de los varones estériles estando asociadas a casos de oligospermia (Chandley, 1998).

La translocación Robertsonianas fue descrita en 1916 por W. Robertson y representa la fusión pericéntrica entre 2 cromosomas acrocéntricos, es decir, entre los cromosomas 13,14,15,21 y 22. El resultado es un único cromosoma anómalo, generalmente dicéntrico,

conteniendo el brazo largo de los cromosomas implicados con pérdida de los brazos cortos (R.J.M. Gardner, G. R. Sutherland. 2ª ed. New Cork; 1996). Las combinaciones más frecuentes son entre los cromosomas 13 y 14 y entre los cromosomas 14 y 21. La translocación (13;14) es la más frecuente, con una incidencia de 0.7 cada 1000 nacidos (Nielsen and Wohlert, 1991).

Las translocaciones Robertsonianas pueden ocurrir de novo en aproximadamente el 50% de los casos, o ser transmitida por los progenitores. Como consecuencia de este tipo de translocaciones se puede ver afectada la fertilidad, observándose distintos grados de oligo-asteno-teratozoospermias, y/o el desarrollo del embarazo, debido a una posible alteración de la gametogénesis y/o a la

producción de gametos con una combinación no balanceada. Un cigoto no balanceado puede presentar monosomía o trisomía.

El uso combinado del análisis espermático por técnica de fluorescencia in situ (FISH) junto al diagnóstico genético preimplantacional (DGP), es de gran utilidad en parejas portadoras de dicha translocación.

El análisis espermático por FISH puede ser de gran utilidad para describir la proporción de gametos anormales en hombres portadores de una translocación Robertsoniana, así como para prever la segregación espermática (Estop et al., 1996; Blanco et al., 1998).

El PGD, desarrollado para el tratamiento de parejas con riesgo de transmitir

alteraciones genéticas a sus descendientes, nos permite la selección de embriones no afectados, siendo una alternativa al diagnóstico prenatal.

En el presente trabajo, exponemos la experiencia en dos ciclos de PGD por varón portador de una translocación Robertsoniana entre los cromosomas 13 y 14. La segregación meiótica de los cromosomas 13 y 14 fue analizada en los embriones, y comparada con las anomalías observadas en los espermatozoides.

### MATERIAL Y METODOS

El estudio fue realizado a dos parejas que acudieron a la Unidad de Reproducción de la clínica Ginemed, tras varios años de esterilidad y abortos repetidos en ambos casos.

Tras la anamnesis inicial de la pareja, fueron solicitadas pruebas hormonales, serológicas así como cariotipo a ambos miembros de la pareja y estudio seminal al varón.

El cariotipo en sangre periférica se realizó en la Unidad de Genética de la Clínica Ginemed mediante cultivo de linfocitos en medio PB-Max y tinción de bandas G.

El estudio seminal se realizó en la Unidad de Andrología según protocolo de la Organización Mundial de la Salud (OMS-99).

La paciente 1 tenía 36 años de edad. Su pareja, con 38 años, presentaba un cariotipo con una translocación entre los cromosomas 13 y 14: 45 XY, t (13,14)(q10;q10). Tras el análisis espermático fue diagnosticado de oligo-teratozoospermia severa y astenozoospermia moderada.

La paciente 2 presentaba 38 años de edad, y su pareja, con 37 años era portador de una translocación entre los cromosomas 13 y 14: 45 XY, t (13;14)(q10;q10). En este caso, el varón presentaba un recuento y una motilidad espermática normal con una teratozoospermia severa.

En ambos casos, las mujeres presentaban un cariotipo 46 XX, y era el primer ciclo de Fecundación in Vitro al que se sometían tras haber sufrido 2

abortos en el primer caso y 3 en la segunda pareja.

### ANÁLISIS DE FISH EN ESPERMATOZOIDES

El FISH en espermatozoides se realizó según protocolo estándar (Munné et al, 1998), empleando una mezcla de hibridación que contiene un Indicador Locus Específico (LSI) para el cromosoma 13, visualizándose a la luz naranja, y teloméricas para 14q en el espectro verde.

Las muestras seminales fueron fijadas con la mezcla metanol: acético 3:1. Posteriormente, los portos con las muestras fijadas fueron incubados en la solución dithiothreitol (DDT)/ Triton X-100 al 1%. A continuación se realizó una hibridación con mezcla de sonda para los cromosomas 13 y 14.

Los portos con las muestras fueron observados en un microscopio de fluorescencia (Nikon E-400) con los filtros apropiados para la visualización de los cromosomas.

### ESTIMULACIÓN OVÁRICA

En ambos casos se realizó una estimulación ovárica utilizando un protocolo largo tras un mes de reposo ovárico con anticonceptivos. Para la supresión se ha utilizado análogos de la GnRH (Synarel diario®) desde la mitad de la fase lútea previa a dosis de 1 pulverización cada 12 horas intranasal. Según los niveles séricos de FSH, LH y estradiol y en función de la edad de la paciente se fijan las dosis de estimulación ovárica con hormona folículo estimulante (FSH) (Gonal-F®) y Menotropina (HMG Lepori®). La administración de estos se individualiza de acuerdo al control ecográfico del ciclo. El criterio para la administración de la hormona gonadotrófica humana (1000 UI HCG) (HCG Lepori®) es la presencia de al menos dos folículos de 16 mm. De diámetro. La administración de aGnRH y FSH se suspende el día de la administración de la HCG.

Las punciones se realizaron a las 36 horas de la administración de la HCG por vía vaginal ecoguiada.

Las muestras usadas para ICSI se

prepararon mediante combinación de dos procedimientos: gradientes de densidad en capas de 0.3 a 1 ml de 40% y de 0.3 a 1 ml de 80% de Sperm Grad (Vitrolife®) y Ham F-10 (Gibco) con gentamicina, seguido por un swim-up usando como medio final Gamete (Vitrolife®).

La microinyección se realizó entre las 3 y 6 de la captación oocitaria descrita en detalla por Svalander et al. Previamente el cúmulo fue eliminado con HYASE 10 en G-Mops en microgotas de 25 µL durante segundos y finalmente pasando repetidas veces por micropipetas de distinto diámetro en G-Mops. La fecundación se evaluó a las 16-20 horas. A los tres días de la punción se evaluaron los pre-embriones, realizándose la biopsia en aquellos donde estaba indicado.

### DIAGNOSTICO GENETICO PREIMPLANTACIONAL

Pareja 1: Se procedió a la biopsia de 4 pre-embriones que en día +3 estaban en estadio de ocho células.

Pareja 2: Se biopsiaron un total de 12 pre-embriones que en día +3 tenían un número de células mayor de 6.

Una célula por embrión fue biopsiada y posteriormente fijada según la técnica de Tarkoswky(1996): metanol:acético (3:1). Una vez fijadas las blastómeras, fueron analizadas por FISH, estudiándose los cromosomas 13, 16, 18, 21, X e Y.

### RESULTADOS

Tras la realización del FISH en las muestras seminales de ambos pacientes se obtuvieron los siguientes resultados: en la pareja 1 se observó que un 5.62% de los espermatozoides estudiados presentaban disomía para el cromosoma 13 y un 6.78% de los espermatozoides eran disómicos para el cromosoma 14. Para la pareja 2 se observó que un 6.52% de los espermatozoides eran disómicos para el cromosoma 13 y un 7.82% de ellos presentaban disomías para el cromosoma 14 (Tabla 1).

Respecto a los pre-embriones biopsiados, a la pareja 1 se le biopsiaron un total de 4 pre-embriones siendo 3 de ellos equilibrados y 1 desequilibrado.

Tipo de anomalía	Paciente 1	Paciente 2
Espermatozoides analizados	1074	10025
Balanceados	78.4 %	71.66 %
Disómicos para cromosoma.13	5.62	6.52
Disómicos para cromosoma.14	6.78	7.82
Nulisómoicos para cromosoma 13	3.4	5.6
Nulisómoicos para cromosoma 14	5.8	8.4
Espermatozoides no balanceados	21.6 %	28.34 %
<b>Total</b>	<b>100%</b>	

Tabla 1. – Análisis espermático.

A la pareja 2 se le biopsiaron un total de 12 pre-embriones, con 5 de ellos equilibrados y un pre-embrión equilibrado pero no informativo para el cromosoma 16. (Tabla 2).

Las aneuploidías para los cromosomas implicados fueron monosomías para el cromosoma 14 y monosomías/trisomías para el cromosoma 13.

Embrión	13	14	16	18	21	22	XY	Diagnóstico
<b>Paciente 1</b>								
1	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
2	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
3	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
4	1	1	2	2	1	1	2	Anormal/Desequilib
<b>Paciente 2</b>								
1	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
2	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
3	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
4	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
5	1	2	2	1	2	1	2	Anormal/ Desequilib
6	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
7	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
8	2	1	2	2	2	2	2	Anormal/Desequilib
9	3	2	2	2	2	2	2	Anormal/Desequilib
10	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado
11	1	1	2	2	2	2	2	Anormal/Desequilib
12	2	2	2	2	2	2	2	Normal/Equilibrado

Tabla 2. Resultados del PGD

Un 75% de los preembriones analizados en el caso de la paciente 1 y un 66% en el caso de la paciente 2 no presentaban anomalías en los cromosomas implicados en la translocación. Esto es similar a la anomalías detectadas en los espermatozoides en ambos casos (78.4% en la pareja 1 y 72% en la pareja 2).

En ambos casos se realizó una transferencia de 2 pre-embriones, criopreservándose los restantes por la técnica de vitrificación, según protocolo de Kuwayama M. (Kuwayama M., 2007).

## DISCUSIÓN

El análisis espermático por FISH nos da información acerca de la proporción de espermatozoides normales en pacientes portadores de anomalías cromosómicas. Mediante este análisis también podemos predecir la proporción de gametos con anomalías que nos vamos a encontrar tras la realización de un ciclo de fecundación in Vitro y posterior diagnóstico preimplantacional.

Los pre-embriones resultantes de la fecundación de espermatozoides portadores de una translocación robertsoniana entre los cromosomas 13 y 14 pueden ser portadores de cromosomas derivados dicéntricos que se han formados como consecuencia de roturas en los brazos cortos de ambos cromosomas ( Han JY, et al). Estos pre-embriones, si no son analizados, pueden dar lugar a abortos repetidos.

Mediante la combinación de un ciclo de Fecundación in Vitro seguido de un diagnóstico Genético Preimplantacional, se realiza una selección de aquellos pre-embriones "normales" o equilibrados, pudiendo evitar así el aborto que sufren estas parejas.

En nuestro estudio tras el análisis del PGD se observa que aunque el número de gametos equilibrados en ambos casos (75% y 66%) es comparable con la proporción de espermatozoides normales en el eyaculado (78.4% y 71.66). Otras anomalías de los pre-embriones pueden ser debidas a factores oocitarios y/o efectos post-meióticos.

Este trabajo muestra que la proporción de pre-embriones anormales debido a la

translocación Robertsoniana (13;14) es similar a la proporción de espermatozoides anormales encontrados en los varones portadores de la translocación. Así, el análisis espermático mediante la técnica de FISH sería de gran utilidad para predecir el número de pre-embriónes normales que nos encontraríamos tras la realización de un ciclo de Fecundación in Vitro en parejas portadoras de la translocación. Esto nos permite que mediante una prueba sencilla y barata, orientar a las parejas sobre el número de pre-embriónes sin anomalías que se podrían esperar tras un tratamiento de reproducción asistida. En aquellos casos en los que el número de espermatozoides con anomalías sea muy alto, se puede indicar el uso de un semen de donante.

## BIBLIOGRAFIA

1.- Nielsen J, Wohler M. 1991. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn

children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. Hum Genet 87: 81 – 83.

2.- Gardner, R.J.M. and Sutherland, G.R. (1996) Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. 2nd end, Oxford University Press, Oxford.

3.- Chandley AC. 1998. Meiotic studies and fertility in human traslocation carriers. In: The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements, Daniel A. (ed). A. R. Liss: New York, 361 – 382.

4.- Guichaoua MR, Quack B, Speed RM, Noel B, Chandley AC, Luciani JM. 1990. Infertility in human males with autosomal traslocations: meiotic study of a 14;22 Robertsonian traslocation . Human Genet 86: 162 – 166.

5.- Estop AM, Van Kirk V, Cieply K. 1996. Segregation analysis of four traslocations, t (2;18), t (3;15), t(5;7) and t(10;12), by sperm chromosome studies and review

of the literature. Cytogenet Cell Genet 70: 80-87.

6.- Svalander P, Forsberg AS, Jakobsson AH, and Wikland M.: Factor of importance for the establishment of a successful program of intracytoplasmic sperm injection treatment for male infertility. Fertil. Steril.1995 ; 63: 827 – 837.

7.- Han JY, Choo KH, Shaffer LG. 1994. Molecular cytogenetic characterization of 17 rob (13q 14q) Robertsonian traslocation by FISH, narrowing the region containing the breakpoints. Am J Hum Genet 55: 960-967.

8.- Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. Theriogenology 2007 Jan 1; 67 (1): 73 – 80.

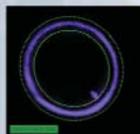
**OLYMPUS**  
Your Vision, Our Future



## La calidad, nuestro objetivo

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

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



### OCTAX polarAIDE

OCTAX polarAIDE evaluación automática de la calidad de los ovocitos

Visualización del huso y comprobación de la viabilidad de congelado-descongelado de los ovocitos en metafase II



### pH Online™

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



### OCTAX Laser Shot™

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

**OCTAX**

# LAS APARIENCIAS A VECES ENGAÑAN, LA VERDADERA BELLEZA ESTÁ EN EL INTERIOR.

**YOU CAN'T JUDGE A BOOK BY ITS COVER, TRUE BEAUTY IS WITHIN.**

Olmedo Illueca, C.; Lozano Zamora, M.; Iñiguez Tornero, J. y Cuevas Sáiz, I.

Consortio Hospital General Universitario de Valencia (Unidad de Reproducción Humana). Avda / Tres Cruces s/n Valencia

Correo electrónico: carla.olmedo@gmail.com

## RESUMEN

La evaluación de embriones mediante criterios morfológicos ha sido hasta ahora la única herramienta fiable de selección. Sin embargo, los avances en técnicas de biología molecular como la proteómica o la metabolómica nos permiten descubrir nuevos métodos que, acompañados de los criterios morfológicos, nos permitan escoger los embriones con mayor potencial de implantación. Con ello, no sólo conseguiremos aumentar las tasas de embarazo, sino que además evitaremos la necesidad de transferir más de un embrión y el posible riesgo de embarazo múltiple.

Palabras clave: marcadores no-invasivos, Viabilidad embrionaria, proteómica, metabolómica.

## SUMMARY

Embryo evaluation using morphological criteria has been the unique trustworthy method of embryo selection. However, new advances in molecular biology techniques like metabolomics and proteomics can permit to choose the embryo with the best implantation potential. Therefore, we will be able to increase pregnancy rates but furthermore avoid the need to transfer more than one embryo and his multiple pregnancy risk.

Keywords: Non-invasive biomarkers, Embryo viability, proteomics, metabolomics

## INTRODUCCIÓN

La reproducción asistida se ha convertido en la única esperanza para muchas parejas con problemas de infertilidad. Sin embargo, esta técnica resulta ineficiente, ya que tan solo entre un 10-30% de todos los embriones que se transfieren al útero materno implantarán y acabarán en embarazo evolutivo (Lieberman et al., 2001).

Muchos son los factores involucrados en la llegada a término del embarazo, pero sin duda el protagonista de esta historia es el embrión. El embrión humano debido a su gran plasticidad es capaz de evolucionar incluso en condiciones subóptimas. Sin embargo esto podría tener ciertos costes, siendo una de las principales causas de los fallos de implantación en las técnicas de FIV.

Hasta hace relativamente poco tiempo la selección del embrión/es a transferir

estaba basada únicamente en criterios morfológicos. Estos parámetros, a pesar de tener la ventaja de ser no invasivos, tienen el inconveniente de ser a veces inexactos y subjetivos. En los últimos años, técnicas como la metabolómica y la proteómica son capaces de aportar información clínica importante acerca de los cambios que acontecen en el ambiente del embrión. Con la creación de las ``ómicas`` podremos identificar nuevos marcadores de viabilidad embrionaria no invasivos. Sin embargo, a día de hoy, se hace necesario acompañar estas nuevas herramientas con criterios morfológicos para seleccionar un embrión. Pero en un futuro no muy lejano quizá podamos elegir un solo embrión sin tener que fijarnos únicamente en su aspecto. Porque las apariencias a veces engañan....

## METABOLÓMICA

La morfología de un embrión tiene un

valor predictivo limitado para determinar su viabilidad y posibilidad de dar embarazo, por lo que se necesitan nuevas herramientas que nos conduzcan a la transferencia embrionaria única (SET).

Una aproximación hacia el problema de la evaluación de la viabilidad embrionaria sería la valoración del perfil metabólico del medio de cultivo consumido por el embrión. Es lógico pensar que el metabolismo de un embrión sano podría alterar el medio que le rodea de forma distinta que uno menos sano y por lo tanto con menor potencial implantatorio. El perfil metabólico debería ofrecer la ventaja de evaluar de forma simultánea un gran número de analitos en el medio, y producir un perfil que podría estar asociado con la viabilidad embrionaria. Se ha obtenido recientemente el perfil metabólico del cultivo de embriones humanos mediante espectroscopía Raman o NIR (Near-infrared

spectroscopy). Existe un método para detectar el perfil metabólico en medios de cultivo de embriones de FIV/ICSI que muestra la habilidad para valorar el potencial reproductivo de un embrión (Seli et al., 2007). Esa información se obtiene midiendo biológicamente las concentraciones de grupos funcionales clave como R-OH, -SH, C-C, -CH, -OH y -NH mediante el uso de espectroscopia infrarroja cercana (NIR). Estos son sensibles a especies reactivas del oxígeno, y la variación entre embriones viables y no viables puede ser resultado de una modificación oxidativa. El espectro obtenido por NIR mostró un aumento en los grupos -OH y descenso de los grupos -CH y -NH.

El modelo de estimación de la viabilidad enfatiza en las diferencias existentes entre -CH y -NH. Estos resultados son consistentes con el concepto de que un embrión, cuando madura, consume el medio de cultivo modificando su pool. Es notable que -SH, -CH, -NH y -OH son biomarcadores del estrés oxidativo y se ha demostrado que afectan a la viabilidad embrionaria. Mediante un algoritmo genético se discriminan los embriones que dan embarazo positivo y negativo según su perfil metabólico.

Esto da como resultado un score de viabilidad embrionaria para medir el potencial del embrión para desarrollarse de forma correcta, implantar y dar lugar a una gestación evolutiva.

De forma retrospectiva se ha intentado comprobar si el perfil metabólico de los constituyentes se correlaciona con el embarazo cuando los embriones transferidos se seleccionaron por criterios morfológicos porque no todos los embriones con buena calidad morfológica implantan. Para ello los pacientes se dividieron en grupos. Aquellos con una tasa de implantación del 100% representaron el grupo cuyos embriones tenían potencial reproductivo probado, y aquellos con una tasa del 0% se seleccionaron para representar a los embriones sin potencial de implantación. Las muestras que se analizan son aquellas obtenidas de día 3 y día 5 de desarrollo post-inseminación. Se comparan ambas muestras mediante sus índices de viabilidad usando análisis estadístico de la t-Student y se

obtuvieron mejores resultados para las muestras en día 3. Los índices de viabilidad de las muestras con implantación fueron mayores (0.94) que los que no implantaron (0.56). Se crearon curvas ROC (Receiver operator characteristic) para identificar el valor umbral con mejor mezcla de sensibilidad y especificidad. Este valor umbral fue después aplicado a los datos para calcular valores predictivos positivos y negativos. La curva ROC indica que mediante el índice de viabilidad de 0.76 podemos ser capaces de discriminar entre embriones con alto potencial con una sensibilidad y especificidad del 82.4% y 69% respectivamente. Y una exactitud del 75.8%.

Las muestras obtenidas de blastocistos en día 5 fueron evaluadas de igual forma. Las muestras asociadas a la implantación tuvieron unos índices de variabilidad más altos (-0.40) que aquellas con fallo de implantación (-0.81). Se completó una curva ROC que identificó el mejor valor umbral de -0.43. Usando este valor, la sensibilidad y especificidad fue del 100%.

Los resultados sugieren que los embriones que implantan y acaban en embarazo modifican su ambiente de forma distinta que los que no implantan. Si se compara la exactitud de los criterios morfológicos y los metabólicos, estos últimos tienen un 15% más de acierto que los morfológicos después de la transferencia única (SET) en día 3 post-inseminación y un 40% en día 2, cuando la transferencia se lleva a cabo independientemente de los criterios morfológicos

Por tanto los cambios en el medio de cultivo por oxidación pueden ser un indicador del potencial y son independientes de los criterios morfológicos.

En la práctica estos datos sugieren que la metabólica podría usarse junto con la morfología para seleccionar un embrión.

La GM-CSF (Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor) es una citokina perteneciente a la familia de factores de crecimiento hematopoyéticos secretada por el tracto femenino de

humanos y mamíferos al comienzo del embarazo. Su función es regular el número y viabilidad de los blastocistos y su presencia en el ambiente constituye un elemento clave en la implantación, crecimiento y desarrollo fetal.

Esta citokina varía su concentración en función de la edad de la paciente. En aquellas menores de 30 años la concentración es significativamente mayor que en aquellas con 37 años o más. También se ha visto que existe relación entre la G-CSF y los niveles de Estradiol. A medida que aumenta la concentración de citokina en suero disminuye el nivel de Estradiol. Existe correlación entre los niveles de G-CSF y estradiol en suero el día de la punción. En cambio no había diferencias entre folículos de ovocitos fecundados y no fecundados. El hecho de que los niveles fueran superiores en líquido folicular nos indica la producción intrafolicular de esta citokina y el papel auto/paracrino que ejerce en el ambiente folicular.

Mediante Western-Blot y técnicas inmunohistoquímicas se han localizados sus receptores en el ovario, principalmente en las células de la granulosa y células luteales.

Se realizó un estudio comparativo de los embriones procedentes de líquido folicular con concentraciones por encima y por debajo de 20 pg/ml, que constituye el ratio del embrión peor y el mejor. Para decidir el valor límite de G-CSF que determina que concentración de citokina marca el potencial de implantación de cada ovocito y su correspondiente embrión se realizó una curva ROC. El valor límite por debajo del cual no ocurre la implantación es 20 pg/ml. Sin embargo, cuando la concentración supera 24 pg/ml el valor predictivo positivo alcanza un 40%.

Los resultados muestran claramente que pacientes embarazadas revelaban un aumento constante de citokina desde la transferencia a la implantación. Sin embargo aquellas que no resultaron embarazadas mostraban un ligero aumento seguido de un descenso los días 6-8 de estimulación, marcando con ello el comienzo de un nuevo ciclo.

Otros autores pretenden identificar las diferencias en el perfil proteico entre blastocistos humanos usando Arrays. Se analizan un total de 120 proteínas del medio de cultivo (CCM, Vitrolife) de blastocistos. Si se compara el perfil proteico de aquellos blastocistos que implantaron respecto a los que no implantaron se encuentran diferencias únicamente en dos proteínas, que son CXCL13 (B-cell attracting homing chemokine) y GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Estas dos proteínas disminuían su nivel en el medio de cultivo de embriones viables. La GM-CSF es un factor que previene la apoptosis (Sjoblom et al., 2002) y promueve el desarrollo *in vitro* (Sjoblom et al., 1999). Y no sólo es esencial para el desarrollo, sino también para la implantación (Robertson et al., 2007). Podría por tanto ser considerado un biomarcador de viabilidad embrionaria.

La CXCL13 no tiene funciones relacionadas con la implantación o el desarrollo, pero sí para el sistema inmune aunque no se conoce demasiado acerca de ella.

Por tanto, la G-CSF tiene un papel primordial en el desarrollo folicular, la implantación, la ovulación y el mantenimiento del embarazo. Constituye un biomarcador no invasivo que promueve la transferencia única porque evalúa al ovocito de forma individual y nos ayuda a identificar el mejor protocolo de estimulación. Pero el uso de estas proteínas como criterio de selección embrionaria necesita aún de más estudios.

Las células de la granulosa son las únicas encargadas de producir la hormona anti-Mülleriana (AMH) desde el nacimiento. Esta hormona alcanza su máximo nivel en la pubertad y continúa presente en edad adulta a nivel basal.

Hasta ahora sólo se conocía su función como factor pronóstico de la reserva ovárica. Se ha visto que los niveles de hormona son más bajos en mujeres con baja respuesta que en aquellas con respuesta normal (Elgindy et al., 2008). Sin embargo esta hormona además de predecir la edad ovárica constituye un marcador de calidad embrionaria.

Parece que la cantidad de oocitos y la calidad de los embriones son inversamente proporcionales a la edad de la mujer, cuya respuesta ovárica, como hemos citado anteriormente, se predice con la concentración de dicha hormona en suero. Cuando la concentración de hormona es elevada en líquido folicular el día de la administración de hCG, la calidad embrionaria, la tasa de implantación y, por tanto, la de embarazo aumentan.

Otros autores demuestran que en aquellas pacientes cuyos oocitos fecundaron, la concentración de AMH en líquido folicular fue más elevada que en aquellas a las que no les fecundaron.

Según S.L. Broer et al., 2008 la AMH tiene la misma capacidad de predecir baja respuesta ovárica a la estimulación y no embarazo en FIV que el recuento de folículos antrales.

Para determinar la concentración de hormona se puede utilizar un ELISA, concluyendo que un desarrollo embrionario mejor de lo normal y unas tasas elevadas de embriones de buena calidad se correlacionan con un incremento de AMH en el líquido folicular. Por lo tanto, la determinación de AMH en líquido folicular resultaría útil en la predicción de calidad embrionaria.

La HLA-G es una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I no clásica. Adopta siete isoformas, resultado del splicing alternativo de un mismo RNA inmaduro, cuatro se encuentran ligadas a la membrana (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) y las otras tres formas son solubles (sHLA-G5, -G6, -G7), además presenta una limitada distribución en los tejidos, expresándose de forma selectiva por las células del citotrofoblasto veloso en la interfase materno-fetal.

Desarrolla un papel importante en la inmunoprotección del embrión, por ello podría jugar un papel esencial en diálogo madre-embrión protegiendo al feto de ser rechazado por la madre.

Desde la primera vez que fue identificado en medios de cultivo embrionario (HTF Irvine Scientific, CA, USA) o (KSOM Gibco BRL, Grand Island,

NY, USA) (Jurisicova et al., 1999) algunos artículos relacionan su concentración con una mayor tasa de división embrionaria o con una condición imprescindible para lograr embarazo, pero todos la asocian con un mayor éxito en la tasa de implantación de dichos embriones (Noci et al., 2005; Sher et al., 2005).

Sin embargo no todos los trabajos están de acuerdo con estos hallazgos. Algunos autores solo detectan s-HLA-G en trofoblasto y no en cultivos de embriones de 8 células ni tampoco en blastocistos. Todos estos desacuerdos podrían venir dados por la especificidad y la sensibilidad de los medios de detección utilizados y por el tipo de medio de cultivo utilizado. Además, parece que también se observa variabilidad entre diferentes lotes del mismo medio.

En cualquier caso, la detección de s-HLA-G podría ser un posible biomarcador de la capacidad implantatoria del embrión, ya que sería un método no invasivo que permitiría realizar la selección embrionaria sin atender únicamente a criterios morfológicos.

## PROTEÓMICA

Se conoce poco sobre la producción de proteínas del embrión de humano, en particular de las proteínas que produce el embrión y son secretadas al medio que le rodea (secretoma). Las proteínas son responsables de la mayoría de funciones que dictan como un embrión reaccionará a su ambiente.

Los avances en espectroscopia de masas han sido revolucionarios para la proteómica. Mediante el uso de perfiles de expresión se identifican proteínas implicadas en procesos biológicos.

Surface-enhanced láser desorption and ionization time-of-flight mass spectroscopy (SELDI-TOF MS) es uno de los más recientes desarrollos de la proteómica basado en capturar proteínas y péptidos por superficies químicamente modificadas y es altamente sensible para el análisis de muestras biológicas complejas. La sensibilidad del SELDI-TOF MS permite el análisis de pequeñas concentraciones de

proteínas secretadas por el embrión a lo largo de su desarrollo.

La novedad está en que utiliza superficies químicas en chips que permiten capturar subclases de proteínas. Una vez unidas al chip las proteínas son ionizadas usando un láser que desorbe en un gas cargado positivamente. El tubo del TOF crea un vacío que permite la separación e interpretación de iones de acuerdo a su masa/carga.

Usando SELDI-TOF MS se ha desarrollado un sistema capaz de analizar el proteoma de un blastocisto humano, y la meta es identificar las proteínas y los eventos críticos que ocurren justo antes de la implantación.

Se utilizan blastocistos de morfología similar pero con diferencias en el tipo y la intensidad de algunas proteínas y péptidos. Cuando los blastocistos se compararon por análisis estadístico con embriones degenerados se encontraron muchas diferencias en proteínas cargadas negativamente.

Los datos han identificado un potencial candidato implicado en apoptosis e inhibición del crecimiento, la Heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor precursor (HB-EGF) es un potencial candidato implicado con la interacción entre el trofoectodermo y el epitelio luminal del útero materno en la implantación del blastocisto. Es un estimulador del crecimiento, relacionado con el hatching.

Otro de los candidatos es la cystatin-like precursor. Como se sabe que las cistatinas inhiben las cisteína proteinasas, el feedback positivo de esta proteína contribuiría al fallo de implantación de embriones degenerados.

Los estudios han demostrado que los embriones, cada 24 horas secretan distintas proteínas. Esos perfiles proteicos caracterizan el estadio de desarrollo de ese embrión por su secretoma solo, independientemente de la morfología. Los análisis revelan la expresión de varios biomarcadores diferentes solo en puntos específicos cada 24 horas.

El análisis del secretoma de blastocistos humanos que se desarrollan reveló diferencias significativas en la expresión de una proteína de 8.5-kDa. Los embriones que se desarrollaron correctamente mostraron fuerte expresión de esa proteína mientras que los degenerados mostraron ausencia. Esta proteína también se detecta significativamente en estadio de blastocisto y es el biomarcador más abundante en el secretoma en día 5. Esta proteína ha sido identificada como la ubiquitina y está implicada en implantación.

En cuanto a biomarcadores de viabilidad, los blastocistos humanos de morfologías similares muestran perfiles proteicos distintos. Los embriones degenerados y los que se desarrollan también varían en cuanto a las proteínas implicadas en apoptosis e inhibición de crecimiento. En blastocistos de una misma paciente y con morfologías similares varía enormemente su huella dactilar metabólica (Gardner et al., 2001).

Esto indica que existen diferencias significativas en la expresión de proteínas independientemente de la morfología.

El recambio aminoacídico constituye un método no-invasivo de selección embrionaria basado en el depleción/aparición de aminoácidos en el medio de cultivo (Leese, 1994; Houghton, 2002; Brison, 2004). Parece estar relacionado con la habilidad de un embrión para implantar y dar embarazo. Esto es independiente de otros indicadores de embarazo como la edad materna, reserva ovárica y número de células embrionarias y grado.

El análisis mediante HPLC (High performance liquid chromatography) permite ver los cambios que se producen en la concentración de aminoácidos en el medio de cultivo individual de embriones humanos cada 24 horas. Los datos obtenidos retrospectivamente llevan a la conclusión de que existen diferencias claras en el recambio aminoacídico entre embriones evolutivos y no evolutivos.

En la figura 1 se puede ver la concentración relativa de 18 aminoácidos en el medio de cultivo,

junto con la concentración en aquellos pacientes con y sin consecución de embarazo.

Los análisis muestran que la Asparagina (Asn), Glicina (Gly) y leucina (Leu) están relacionadas con el embarazo clínico y nacimiento. Leu, Gly y Serina (Ser) son las menos abundantes en el medio de embriones de ciclos exitosos mientras que Asn y Arginina (Arg) son los más abundantes.

El número de células y el Embryo Score parece que se correlacionan únicamente con la Glu. No sabemos exactamente que aspectos de la viabilidad embrionaria se reflejan en el recambio aminoacídico, pero lo que sí se sabe es que los aminoácidos cuyo recambio predice la formación del blastocisto no son los mismos que predicen el embarazo (Houghton et al., 2002). Los blastocistos formados in vitro se predicen mediante la Ala, Arg, Gln, Met y Asn entre los días 2 y 3 post-inseminación (Houghton et al., 2002) mientras que para el embarazo se miden la Asn, Gly y Leu entre los días 1 y 2 post-inseminación. Esto refleja el hecho de que no todos los blastocistos formados in vitro son viables. A lo largo del desarrollo los embriones pasan de necesitar Leu en día 2-3, Ser, Arg y Leu en 8 células y Ser, Leu, Arg, Met y Valina durante el paso de mórula a blastocisto. En cambio los embriones que se detienen usan 7 y 6 aminoácidos en día 2-3 en 8 células.

Esto nos da una idea de las necesidades nutricionales del embrión y su posible relación con la fisiología y desarrollo del mismo. Y nos indica que los embriones que se detienen son metabólicamente más activos que los embriones que se desarrollan. Esto implica que la calidad oocitaria debe jugar un rol mayor en la determinación de la viabilidad embrionaria puesto que la activación del genoma no se detecta hasta estadio de 4-8 células.

## CONCLUSIÓN

Actualmente, continuamos trabajando de forma rutinaria en la valoración morfológica de gametos/embriones, pero gracias a los estudios que se están realizando se confirma que los embriones

no son entidades estáticas, sino que intercambian metabolitos con el medio que les rodea y a su vez lo modifican, pudiéndose utilizar las medidas de esa modificaciones como herramientas de selección adicionales a la morfología.

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction* 17: 999-1005.

Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, Frankenne F, Foidart JM, Maggi E, Romagnani S, Ville Y, Piccinni MP. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Human Reproduction* 23:2001-2009.

Lie Fong S, Baart EB, Martini E, Schipper I, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone : a marker for oocyte quantity, oocyte quality and embryo quality ? *RBM Online* 16:664-670.

Salmasi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K, Hedderich J, Jonat W, Mettler L. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Human Reproduction* 20:2434-2440.

Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns D. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded study. *Fertil Steril* 90:77-83.

Seli E, Sakkas D, Scott R, Kwok SC, Rosendahl SM, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 88:1350-1357.

Sher G, Keskinetepe L, Nouriani M, Roussev R, Batzofin J. Expression of HLA-G in supernatans of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of embryo competency and IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 9, 74-78.

Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, Haentjens P. Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis. *Human Reproduction*. 14:209-218.

Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PGA, Burns DH, Lambalk CB. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Human Reproduction*. 23: 1499-1504.

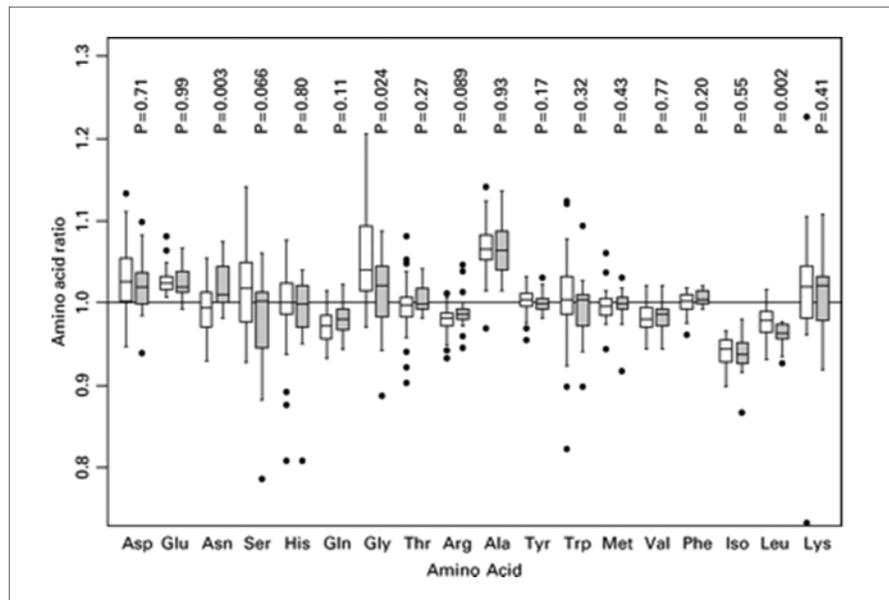


Fig 1. Box plots of the 18 individual amino acids showing the medians (thicker lines), inter-quartile ranges (boxes), ranges (whiskers; excluding outliers) and outlying observations (open circles) for amino acid appearance in the culture medium. Open boxes are the cycles that did not achieve a pregnancy and shaded boxes those yielding a pregnancy. P-values are for a Mann-Whitney test comparing the two groups for each amino acid.

## BIBLIOGRAFÍA

Brison DR, Houghton FD, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA, Leese HJ. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction* 19: 2319-2324.

Broer S, Mol BW, Hendriks DJ, Broekmans FJ. Anti-Müllerian hormone in IVF outcome prediction: a comparison to the antral follicle count. XXIV Annual Meeting of The European Society of Human Reproduction and Embryology.; 2008 July 6-9; Barcelona, Spain.p.73

Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocyst. *Human Reproduction* 23: 1993-2000.

Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril* 89: 1670-1676.

Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93,161-165.

Juriscova A, Antenos M, Kapasi K, Meriano J, Casper RF. Variability in the expresión of trophoctodermal markers human gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific glycoprotein by the human blastocyst. *Human Reproduction* 14:1852-1858.

Katz-Jaffe MG, Gardner DK, Schoolcraft WB. Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil Steril* 85: 101-107.

Katz-Jaffe MG. Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression ( secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 86:678-685.

Katz-Jaffe MG. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? *RBM Online* August 2008

Medio único

global®



Quermed, s.a.



LifeGlobal  
THE ART MEDIA COMPANY

HTF - HTF Hepes - Aceite - Gradientes - PVP - PGD - Acido Tiroses - Hialorunidas

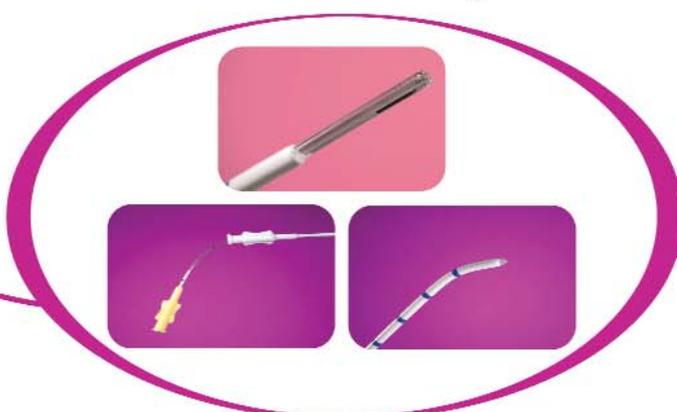
Global para Cultivo - Global para Fertilizar - Global con Hepes



Pipetas ICSI

Catéter de Transferencia Ecogénico

Agujas de punción OPS



Micromanipulador

Termometro FIV

Monitor Volátiles

Medidor de PH

Centrifuga FIV

Placas Calefactadas

Baño en seco

Selladora por ultrasonidos

# FUNDAMENTOS DE CRIOBIOLOGÍA ESPERMÁTICA PARA BANCOS DE SEMEN

## *BASES OF SPERM CRYOBIOLOGY APPLIED FOR SPERM BANKS*

Ana Fernández<sup>1</sup>, María del Carmen Gonzalvo<sup>1</sup>, Ana Clavero<sup>1</sup>, Rafael Ruiz de Assín<sup>1</sup>, Sandra Zamora<sup>1</sup>, María Roldán<sup>1</sup>, Belén Rabelo<sup>1</sup>, Juan Pablo Ramírez<sup>2,3</sup>, Alberto Yoldi<sup>2</sup>, José Antonio Castilla<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Reproducción Humana, Hospital Universitario "Virgen de las Nieves", Granada.

<sup>2</sup> Banco de Semen CEIFER, Granada.

<sup>3</sup> Programa de Control de Calidad Externo para el Laboratorio de Reproducción de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), Madrid.

Para contacto: José Antonio Castilla Alcalá: Unidad de Reproducción. C/ Dr. Azpitarte S/N Edificio de consultas externas Hospital Materno-Infantil CP.18014 josea.castilla.sspa@juntadeandalucia

### RESUMEN

Los espermatozoides tienen unas características especiales para la congelación, en este trabajo se analizan estas características y su influencia en la supervivencia espermática aplicada a los bancos de semen. Entre ellas se encuentran factores propios del tipo celular a congelar y factores dependientes del protocolo de congelación. Dentro de los primeros podemos hablar del tamaño y la permeabilidad celular y entre los segundos nos encontramos la curva de congelación y la adicción de los crioprotectores.

La curva de congelación se refiere a la respuesta celular a la congelación (shock por frío, formación de hielo y descongelación) que puede provocar lesiones crioinducidas como la formación de hielo intracelular, estrés osmótico o recristalización. Para evitar estos daños en todos los protocolos se describe como parte fundamental la adicción de agentes crioprotectores beneficiosos para la supervivencia celular aunque también recogen aspectos perjudiciales como su toxicidad. Por último se analizarán las bases y el papel de la vitrificación de espermatozoides en los bancos de semen.

Palabras clave: banco de semen, criobiología, vitrificación

### ABSTRACT

The spermatozoa have special freezing characteristics, these characteristics and influences on the spermatic survival applied to the sperm banks are analyzed in this work. Among them we find particular freezing factors depending on cellular type and freezing protocol. Among those we will begin with size and the cellular permeability and secondly we will look the freezing curve and the addition of the cryoprotectors.

The freezing curve refers to the cellular response to freezing (cold shock, ice formation, and thawing) which could provoke cryoinjuries such as intracellular ice formation, osmotic stress or re-crystallization. In order to avoid these damages all protocols as a basic measure describe the addition of cryoprotecting agents as beneficial to the survival of the cell although they also inflict detrimental aspects due to their toxicity. Finally the bases and the role of the vitrification of the spermatozoa in the sperm banks will be analyzed.

Key words: sperm bank, cryobiology, vitrification

### INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de la criopreservación de espermatozoides es mantener su viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo. Las células criopreservadas se almacenan a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. A esta temperatura no existen fenómenos ni de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a

cabo reacciones químicas. Por tanto, las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a bajas temperaturas sino de los procesos de enfriamiento y calentamiento.

Durante estos procesos las células se encuentran en suspensión en una solución acuosa. Dicha solución tendrá unas propiedades coligativas que dependen fundamentalmente del

número de moléculas que hay en ella y no de la naturaleza de estas. Así, al añadir un soluto a una disolución disminuye el punto de congelación (punto crioscópico) y la presión de vapor, y aumenta la presión osmótica y el punto de ebullición. La ósmosis es el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto y la presión osmótica es la presión

hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable con un gradiente de concentración. Estas propiedades deberemos tenerlas presentes cuando al disminuir la temperatura durante el proceso de congelación empiece a formarse hielo en el medio extracelular, pues el agua que forma parte del hielo no contiene los solutos que tenía disueltos, aumentando la concentración de estos en el medio extracelular (hiperosmótico) y modificando las propiedades coligativas de este.

Durante estos procesos las células se comportan como osmómetros, variando su volumen en respuesta a los cambios osmóticos extracelulares, así las células pierden o captan agua según se expongan a medios extracelulares hiper o hipo osmóticos, respectivamente; los movimientos de agua y crioprotectores a través de la membrana celular durante la criopreservación se rigen por diversos parámetros biofísicos que deben ser definidos para cada tipo celular a diferentes temperaturas, y en definitiva serán los responsables del daño celular.

### CONCEPTOS GENERALES DEL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS DURANTE LA CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

A modo de ejemplo, podemos considerar una célula como una "bolsa" rellena de una solución salina sumergida en un medio de congelación (medio extracelular). El envoltorio de la bolsa, es decir, la membrana celular tendrá propiedades de membrana semipermeable.

Las dos características principales que van a definir el comportamiento de la membrana son: el tamaño y la permeabilidad.

#### TAMAÑO

Es el área de membrana disponible para intercambiar agua con el medio exterior.

#### PERMEABILIDAD.

Este parámetro define la facilidad con la que el agua puede atravesar la membrana ante un gradiente de concentraciones. La permeabilidad de la membrana celular esta regulada por una ley que refleja el hecho empírico de que

cuanto menor es la temperatura del sistema, menor es la permeabilidad de la membrana. De esta manera la membrana celular pierde su carácter semipermeable para pasar a tener un carácter impermeable, por debajo de una cierta temperatura crítica. Cuando enfriamos el sistema por debajo de dicha temperatura crítica, el proceso de deshidratación se detiene, esto se traduce en un aumento de la probabilidad de formación de hielo intracelular. Experimentos de laboratorio muestran que la permeabilidad de la membrana celular, además de variar con la temperatura del sistema, también depende de la concentración de soluto en el medio extracelular.

El contenido de la "bolsa", es decir, el medio intracelular estará constituido por dos regiones:

#### VOLUMEN OSMÓTICAMENTE INACTIVO

En esta región incluimos orgánulos internos de la célula, el núcleo celular, macromoléculas como por ejemplo proteínas, etc. Son partes internas de la célula que no van a intervenir en el proceso del transporte del agua. Se define como el agua que nunca dejará el interior celular en respuesta a un aumento de concentración de solutos en el espacio extracelular por estar asociado a las macromoléculas y estructuras intracelulares. Si una célula se deshidrata y reduce su tamaño más allá del volumen osmóticamente inactivo puede comprometerse la viabilidad de esta (Hipótesis de volumen mínimo de Meryman para explicar el daño celular durante la congelación) (Meryman, 1970).

#### VOLUMEN OSMÓTICAMENTE ACTIVO

En esta región incluimos la solución intracelular en la que están flotando los orgánulos internos, el núcleo, etc., y que si puede abandonar la célula.

#### RESPUESTA CELULAR A LA CONGELACIÓN

##### SHOCK POR FRÍO Y DAÑO DE ENFRIAMIENTO (DESDE 37°C A 0°C)

El shock por frío (cold shock) es el daño celular debido a la sensibilidad frente a la velocidad de enfriamiento, y es causada por efectos de transición en la

fase lipídica (Drobnis et al., 1993). El daño de enfriamiento (chilling injury) es el daño debido a la sensibilidad frente a una temperatura específica o un rango de temperaturas.

Los ácidos grasos pueden existir en un estado rígido ordenado (gel) o en uno más flexible y relativamente desordenado (fluido). La transición de un estado al otro se da en un rango de temperaturas, la media de la cual se conoce como temperatura de transición de fase ("melting temperature",  $T_m$ ). Esta temperatura de transición será mayor o menor dependiendo de la composición de los ácidos grasos de la membrana. La mayoría de las membranas de células eucariotas tienen su  $T_m$  entre los 0°C y los 20°C.

La transición de fase en una membrana plasmática no se da simultáneamente en todos sus fosfolípidos y por tanto se espera la coexistencia de dominios en estado fluido y dominios en estado gel durante la transición. Esta situación produce defectos en el empaquetamiento de las membranas y está asociado a una mayor permeabilidad de solutos a través de esta. Así, se ha demostrado que al alcanzar la temperatura de transición en una bicapa determinada, se produce la mayor pérdida de solutos a través de la membrana.

Además esta alteración causa alteraciones físicas de la membrana plasmática por la inducción de fallos en el empaquetamiento de lípidos, las alteraciones transitorias de la fase lipídica causan respuestas cinéticas no lineales en algunas enzimas, incluidas algunas ATPasas de membrana. Es probable que tales efectos sean en parte responsables del mal control de la concentración del calcio celular lo que es evidente a temperaturas por debajo de los 17 °C (Bailey et al., 1994).

El choque térmico puede ser mitigado por agentes crioprotectores, la presencia de ciertos fosfolípidos (fosfatidil serina), una congelación lenta y pre acondicionamiento en un medio con un nivel elevado de sales. El espermatozoide humano parece afectarse poco por el shock por frío y daño por enfriamiento, probablemente

gracias a la composición de su membrana (Holt, 2000)

### FORMACIÓN DE HIELO (0°C A <-132°C)

La respuesta de las células al enfriamiento, depende del método de enfriamiento. En particular la velocidad de enfriamiento es el parámetro crítico que determina los resultados del protocolo de criopreservación. A continuación vamos a describir los procesos básicos que han sido observados, cuando se induce hielo en el medio extracelular, en función del perfil de enfriamiento aplicado.

La existencia de solutos en el agua produce un descenso del punto de congelación (punto crioscópico entre -5°C y -10°C) y en consecuencia la cristalización del agua se produce a temperaturas menores a la del punto de congelación del agua pura (0°C). Esto produce, al disminuir la temperatura, un sobreenfriamiento de la muestra (Mazur, 1977). En esta situación el comienzo del proceso de formación de hielo es de naturaleza aleatoria, y depende de la probabilidad de formación de un punto de nucleación, punto de inicio de un frente de cristales de hielo que es inversamente proporcional a la temperatura. Cuanto mayor sea la diferencia entre la temperatura a la que comienza a formarse hielo y la temperatura de cambio de fase, mayor será la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo. En el peor de los casos, puede ocurrir que la temperatura a la que comienza a formarse hielo sea tan baja, que la velocidad de crecimiento de los cristales resulta explosiva. En estas condiciones los cristales de hielo actúan como lanzas que atraviesan las células, destruyéndolas por completo.

Para evitar este problema, en algunos protocolos, se induce la formación de hielo extracelular (nucleación ó seeding), mediante un descenso brusco de temperatura (fig.1) para garantizar que cuando la temperatura del sistema sea la de cambio de fase, tengamos hielo. Existen numerosas maneras de inducir la formación de hielo. En el caso de muestras de células aisladas se toca la muestra con una aguja fría, a una temperatura inferior a la de cambio de fase. Además este descenso de

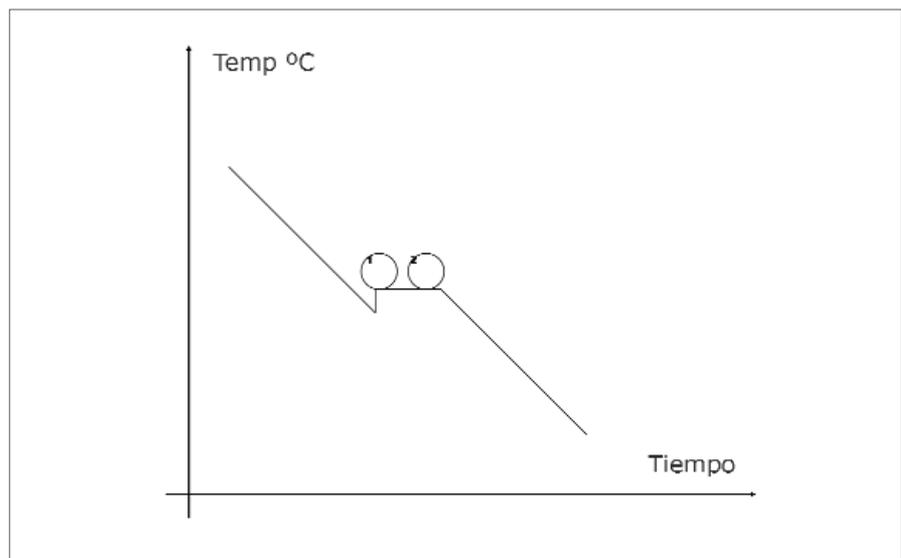


Fig. 1 Curva de congelación.

- (1) Nucleación: liberación de calor por formación de cristales, provocando ascenso de la temperatura.  
 (2) La T° de la muestra no descienda en paralelo con la caída de la temperatura, pudiendo permanecer estática durante 2-3 min.

temperatura inducido pretende evitar fluctuaciones de temperatura sobre las membranas celulares. Esto es debido a que al congelarse el medio de congelación se libera calor por la formación de cristales (calor latente de la fusión) que provoca un fuerte aumento en la temperatura y como consecuencia la temperatura de las células no disminuye en paralelo con la caída de la temperatura del dispositivo de congelación. De hecho, la temperatura de la muestra puede permanecer estática durante 2-3 min antes de reanudarse el enfriamiento. Varios estudios han demostrado que este período entre la formación de hielo y la reanudación de enfriamiento, el punto de congelación meseta, es perjudicial para la supervivencia celular (Fuller et al., 2004). En los protocolos habituales de congelación de semen no se realiza el "seeding" o nucleación inducida pues no se ha visto que mejoren las tasas de supervivencia, lo cual puede ser debido a que el espermatozoide humano contiene una matriz intracelular altamente viscosa gracias a la abundancia de proteínas y azúcares. Su pequeño tamaño, hace que su contenido de agua sea bajo y su estructura compartimentalizada hace que la formación de pequeños cristales intracelulares no afecte a toda la célula sino a zonas aisladas.

La formación de hielo extracelular rompe el equilibrio isotónico por una

única razón: el agua que forma parte del hielo no contiene los solutos que tenía disueltos cuando formaba parte de la disolución acuosa del medio extracelular. Por lo tanto, cuando comienza a formarse hielo fuera de las células, simultáneamente se está produciendo un aumento de la concentración de los solutos disueltos en el medio extracelular.

Mientras tanto, en el interior de las células no se ha producido cambio alguno. Debido a la naturaleza semipermeable de la membrana celular, este gradiente en la concentración de solutos entre el medio extra e intracelular origina una sobrepresión del lado de la disolución que tiene una concentración de solutos menor, que desencadena un flujo de disolvente puro desde la región menos concentrada hacia la región de mayor concentración. Esta sobrepresión se puede interpretar como la diferencia de presiones osmóticas que tienen las dos disoluciones.

Vemos por tanto que la formación de hielo extracelular, tiene como consecuencia la evacuación de agua desde el medio intracelular hacia el medio extracelular, en un proceso que llamaremos Deshidratación Celular.

En el espacio intracelular no tiene lugar la formación de hielo en estos momentos

(<-10°C) posiblemente por la barrera física que impone la membrana celular al proceso de nucleación y al crecimiento de los cristales de hielo. Además, la probabilidad de iniciar la nucleación en el medio intracelular es mucho menor que en el medio extracelular ya que la nucleación está directamente relacionada con el tamaño del compartimiento a congelar (Mazur, 1963).

Paradójicamente la formación de hielo extracelular, en principio podría evitar que se formase hielo dentro de la célula, ya que al aumentar la concentración de solutos en la región intracelular, el punto crioscópico disminuye. Por lo tanto podemos tener una solución intracelular líquida a temperaturas muy inferiores a los cero grados centígrados, que es aproximadamente el punto crioscópico (temperatura en que se produce el cambio de fase líquida a sólida) del medio intracelular original, cuando existía equilibrio isotónico natural. No obstante, esto no llega a ocurrir debido a que la velocidad con que la célula es capaz de evacuar agua es muy pequeña comparada con la velocidad con que disminuye la temperatura.

### DESCONGELACIÓN

Durante la descongelación se reproducen los cambios osmóticos inversos a los descritos para la congelación. Así, cuando el agua congelada cambia de estado (sólido a líquido), la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce progresivamente y la célula vuelve a hidratarse para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior celular.

Generalmente se considera que para la recuperación de las células son necesarias tasas de recalentamiento rápidas. Esto se ha atribuido a la posibilidad de que pequeños cristales de hielo intracelular formados en algunas células durante la congelación podrían crecer durante un proceso lento de recalentamiento, produciéndose el concepto de congelación durante el calentamiento, también llamado recrystalización. Sólo si el calentamiento es tan rápido como para evitar el crecimiento de los cristales de hielo este fenómeno puede evitarse (Rall et al., 1980).

### LESIONES CRIOINDUCIDAS

Cuando la temperatura del medio alcanza los -132°C, el agua no existe en estado líquido y los canales donde se encuentran las células se encuentran en un estado vítreo (con una alta viscosidad) y sin cristalización, un estado en el que los fenómenos de difusión de las reacciones bioquímicas no son posibles (Mazur, 1984) (Tabla 1). Por tanto parece claro

de hielo en la solución extracelular superenfriada (Nei, 1978).

Por otra parte, observaciones experimentales muestran que cuando enfriamos muestras a altas velocidades, la supervivencia de las células al proceso de criopreservación disminuye conforme aumentamos la velocidad de enfriamiento. Y que cuando enfriamos muestras a muy bajas velocidades,

Fase	Razón	Consecuencia	Como evitarlo
Adición de crioprotector (CPA)	Alta concentración de solutos	Deshidratación Hidratación	Añadirlo lentamente
	Toxicidad del CPA		Disminución del tiempo de exposición al CPA
Enfriamiento a temperaturas cerca de 0°C	Transición de fase en lípidos de membrana plasmática	Cambios de permeabilidad	Tasa de enfriamiento lenta y adición de sustancias quelantes y sustancias que interactúan con los lípidos de membrana.
Enfriamiento a temperaturas por debajo de cero hasta -132°C	Formación de hielo extracelular	Deshidratación (contracción)	Tasa de enfriamiento lenta CPA penetrantes y no penetrantes
	Formación de hielo intracelular (Cristalización)	Daño estructural	Tasa de enfriamiento rápida
Almacenaje	Radiación de fondo	Daño lento en el ADN	No es necesario
Descongelación	Formación de hielo intracelular (recristalización)	Daño estructural	Tasa de descongelación rápida
	Disminución de la concentración extracelular de solutos en la descongelación (shock osmótico)	Rehidratación (hinchazón)	CPA no permeables
	Toxicidad del CPA		Disminución del tiempo de exposición al CPA

Tabla 1. Daños espermáticos durante la criopreservación.

que la formación de hielo extracelular no es la responsable del daño celular ya que las células criopreservadas se mantienen en dichos canales de solución no congelada mientras crecen los cristales

la supervivencia de las células al proceso de criopreservación disminuye conforme disminuimos la velocidad de enfriamiento (Fig. 2). Cuando la supervivencia celular se dibuja en función de la velocidad de

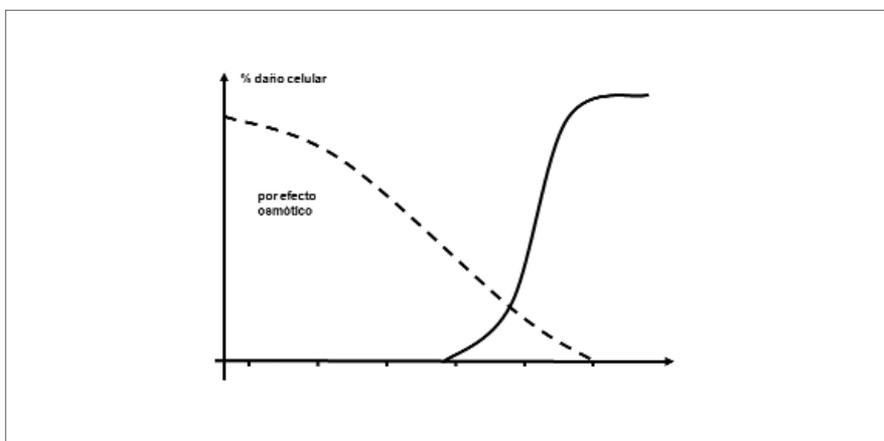


Fig. 2: porcentaje de daño celular en relación a la velocidad de enfriamiento por efecto osmótico (----) ó por formación de cristales (—).

enfriamiento, el resultado produce una curva característica "forma de U invertida" (Fig. 3).

proteínas. Lo que si se sabe es que cuanto mayor sea la cantidad de hielo formado dentro de la célula, menor es la esperanza de que la célula sobreviva.

desnaturalización de estas mediante la formación de puentes de disulfuro entre aminoácidos (Lovelock, 1953; Karow, 1965)

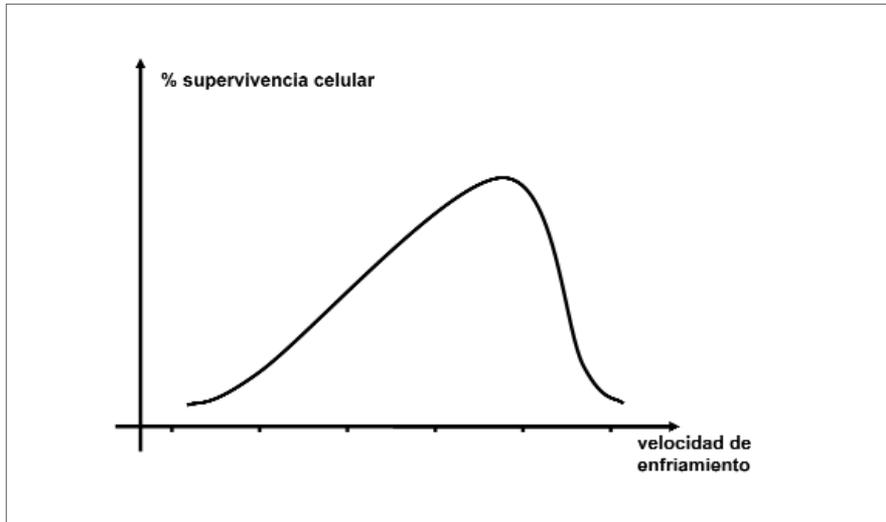


Fig. 3: Relación entre el porcentaje de supervivencia y la velocidad de enfriamiento.

Para tratar de explicar este doble comportamiento de la supervivencia frente a las velocidades de enfriamiento, se ha propuesto una teoría denominada Hipótesis de los Dos Factores (Leibo, 1970). En ella se proponen dos mecanismos distintos como causa de los daños en las células, durante el protocolo de criopreservación (producción de hielo y deshidratación celular o estrés osmótico). Siendo clave para determinar la importancia de cada factor la velocidad de congelación (Fig.2).

### FORMACIÓN DE HIELO INTRACELULAR

A partir de que se inicia la nucleación extracelular y la correspondiente deshidratación celular lo que suceda en el espacio intracelular depende básicamente de la velocidad de enfriamiento (Mazur, 1963; Nei et al., 1970). Si ésta es demasiado rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación intracelular, el agua remanente se congela formando hielo intracelular. La manera en la que este hielo daña a la célula, no es del todo conocido, pero se piensa que es debido a una disfunción de origen mecánico de las propiedades de la membrana celular y de otras estructuras celulares suspendidas en su interior, como pueden ser orgánulos celulares o grandes macromoléculas de

Podríamos pensar, llegados a este punto que un buen protocolo de criopreservación sería aquel en el que la velocidad de enfriamiento fuera tan lenta que apenas formásemos hielo, pues permitirá la salida de todo el agua intracelular. Sin embargo existe otro mecanismo que provoca daños celulares y que precisamente actúa cuando las velocidades de enfriamiento son muy reducidas, lo que hace inviable este protocolo que acabamos de proponer.

### ESTRÉS OSMÓTICO

Este mecanismo, activo a bajas velocidades de enfriamiento, está relacionado con la deformación mecánica de la célula, debida a la reducción de tamaño originada por el proceso de deshidratación tan intenso, y a la prolongada exposición de la célula a elevadas concentraciones de electrolitos. Este mecanismo se conoce como "Efecto de Solución" (Mazur et al., 1970) Existen básicamente dos teorías complementarias para explicar el fenómeno de estrés osmótico durante la criopreservación.

La primera (hipótesis de altas concentraciones de iones) achaca a las interacciones de las altas concentraciones de iones alcanzadas en el medio extracelular con las proteínas de membrana, lo que provocaría la

La segunda hipótesis (hipótesis del volumen celular mínimo) relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico) (Merryman, 1970). Se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán lesiones irreversibles en su permeabilidad y pérdida de lípidos de la membrana celular. Esta pérdida afectaría a la integridad de la membrana plasmática que perdería su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas.

En resumen, a velocidades de enfriamiento lentas el daño celular se produce por la elevada concentración de solutos en el medio extra celular y a elevadas velocidades de enfriamiento por la formación de hielo intracelular. Existe una velocidad de enfriamiento para cada célula en la cual estos dos daños son bajos denominándose, velocidad óptima de enfriamiento, alcanzándose un máximo en la probabilidad de supervivencia de las células a la criopreservación.

A pesar de que se ha comprobado la validez universal de la hipótesis de los Dos Factores en todas las células estudiadas, el protocolo de criopreservación que optimiza la supervivencia no es universal, es decir, cada tipo de célula requiere su propio protocolo optimizado, de acuerdo con sus propiedades biofísicas (Nijs et al., 2001).

### RECRISTALIZACIÓN

El agua en estado líquido, al enfriarse va formando cristales y como hemos comentado esta formación no es homogénea, existiendo al mismo tiempo en estado líquido y sólido. El agua en estado líquido se va haciendo cada vez

mas viscosa, hasta que alcanza los  $-132^{\circ}\text{C}$ , en donde es tan viscosa que no puede convertirse en cristal, llamándose a esa fase estado vítreo.

Todos los materiales biológicos deben almacenarse por debajo de la temperatura de transición de fase del agua de líquido a estado vítreo (aproximadamente  $-132^{\circ}\text{C}$ ) para poner fin a toda actividad biológica. A temperaturas superiores a  $-132^{\circ}\text{C}$  se reduce la longevidad celular a cuestión de semanas o meses, pues aun puede existir agua líquida y por lo tanto actividad celular.

La transición a estado vítreo de una solución acuosa congelada no ocurre repentinamente en  $-132^{\circ}\text{C}$ ; sino que es un fenómeno progresivo entre esta temperatura y  $-90^{\circ}\text{C}$ . En una célula congelada a  $-196^{\circ}\text{C}$  que pasa a  $-80^{\circ}\text{C}$ , algunas moléculas de agua vuelven a estado líquido que pueden convertirse en cristales que provocan pequeños daños de recristalización. El problema es que los pequeños daños son acumulativos; y cada incidente de calentamiento que se produzca por encima de  $-132^{\circ}\text{C}$  (por Ej. El sacar un canastier del nitrógeno líquido para extraer otra pajuela) contribuirá a disminuir la supervivencia funcional de las células criopreservadas.

### AGENTES CRIOPROTECTORES

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación, para ello se añaden al medio de congelación los agentes crioprotectores (CPA). Los CPA son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en el que se induce la nucleación en el espacio extracelular la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela.

Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular.

### CPA PENETRANTES

Son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son: 1,2-Propanodiol (PROH), Dimetilsulfóxido (DMSO), Etilén-Glicol (EG), Glicerol. Todos estos compuestos tienen en común que sus moléculas son pequeñas, es decir, tienen un peso molecular relativamente bajo; así el glicerol tiene 92.09 de peso molecular, lo que le permite atravesar la membrana celular. Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua. Dentro de este grupo el glicerol es el más usado en la criopreservación espermática.

### CPA NO PENETRANTES

Son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. El tamaño de estas moléculas es muy superior a las del grupo anterior. Así por ejemplo, el peso molecular de la sacarosa es 342. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: Sacarosa, Glucosa, Dextrosa, Polivinil-pirrolidona (PVP), Dextrano y Polietilen-glicol (PEG), (en congelación de semen humano las más usados son los dos primeros).

Dependiendo de la permeabilidad del crioprotector utilizado y de su citotoxicidad, la adición se realiza a distintas temperaturas. Los agentes crioprotectores pueden añadirse y extraerse en pasos, es decir aumentando o disminuyendo gradualmente la concentración de crioprotector en el medio, lo que reduce el stress osmótico sobre la célula a congelar; o bien añadirse (o extraerse) en un solo paso, lo que reduce el tiempo de exposición celular al crioprotector.

Existen dos formas diferentes de adición o disminución gradual del CPA al medio. En la primera, la solución de CPA (en el caso de adición) o un medio de cultivo (en el caso de dilución) se añaden en distintos pasos pero con un "volumen fijo". En la segunda, la adición de CPA o diluyente varían en volumen para producir cambios equilibrados en la molaridad del CPA. Esto ha sido denominado como "fixed molar step" (Gao et al., 1995; Gilmore et al., 1997).

Aunque células pequeñas (como espermatozoides) contienen muy poca agua, su cantidad corresponde en gran parte (45-75%) al volumen osmóticamente inactivo, y esto es lo que hace que se deshidrate muy poco en comparación con otras células. Los espermatozoides humanos se pueden hinchar sólo un 110% de su volumen isosmótico original mientras que pueden disminuir un 75% de su volumen y retener  $\geq 90\%$  de su motilidad original (Gao et al., 1995). Como vemos los espermatozoides toleran menos un fuerte hinchazón que un encogimiento, y es por eso que la eliminación del CPA tras la descongelación puede tener un efecto dramático sobre las tasas de supervivencia espermática.

Si la dilución del CPA se realiza en un solo paso, se obtiene un incremento del volumen espermático del 160 % y una pérdida de aproximadamente el 70% de la motilidad. Por el contrario, el máximo aumento del volumen de una célula utilizando una dilución "fixer molar step" nunca supera el límite superior del volumen celular y por consiguiente no tienen ningún efecto adverso sobre la supervivencia espermática. Además la adición de CPA también parece causar menor daño cuando se realiza gradualmente (Gilmore et al., 1997). Todo lo anterior obliga a cuidar al máximo el tiempo empleado en la adición de los medios de congelación al semen y la dilución con medio de cultivo tras descongelación, siendo necesario invertir varios minutos en ello según cada protocolo.

### BENEFICIOS DE LOS CPA

A pesar de que el uso de estas sustancias en los protocolos de criopreservación es una práctica habitual, los mecanismos

de protección no son del todo conocidos. Los mecanismos que con certeza se saben que actúan a favor de la supervivencia celular son mecanismos físicos:

-Dilución de los electrolitos: La alta concentración de los electrolitos en las últimas etapas de la deshidratación celular, fue una de las hipótesis de los mecanismos causantes de la muerte celular. Los CPA protegen a la célula de los efectos de los solutos. Este objetivo se logra porque las CPA diluyen la alta concentración de electrolitos. Este efecto es descrito por la "regla de fases", que establece que en un sistema de dos fases, como agua líquida y hielo a una presión dada, la concentración total de soluto en la fase líquida es constante para una determinada temperatura. Así, como el agua se solidifica en hielo, la solución restante contendrá progresivamente mayores concentraciones de CPA y electrolitos. Como la concentración total de CPA y electrolitos debe ser constante, mayor es la concentración de CPA y menor es la concentración de electrolitos. Así, la CPA efectivamente diluye la concentración de electrolitos en la solución limitando así su toxicidad.

-Disminución de la concentración de agua: El otro mecanismo que causaba muerte celular era la formación de hielo intracelular. Al introducir en el medio más moléculas (de crioprotector), los cristales de hielo en crecimiento tienen una mayor dificultad para encontrar moléculas de agua y seguir así creciendo, reduciendo de esta manera el riesgo de muerte celular.

-Aumento de la viscosidad: Al añadir sustancias crioprotectoras al medio intracelular, la viscosidad de éste aumenta. Esto reduce la movilidad de las moléculas en su seno, por lo que la formación de cristales de hielo se ve menguada, aumentando de esta manera la probabilidad de supervivencia.

-Efecto coligativo: Al añadir un soluto (CPA) a un disolvente (medio de congelación) el punto crioscópico de la solución desciende, necesiándose una temperatura más baja para el cambio de fase. Por lo tanto, las células experimentarían menos estrés salino que si estuvieran bajo las mismas

condiciones sin CPA. Este efecto 'salt buffering' podría impedir el establecimiento crítico de altas concentraciones de soluto en la fracción residual de congelación hasta que el sistema se enfría llegando a temperaturas muy bajas donde toda la actividad molecular es inhibida (Lovelock et al., 1954).

-Otros mecanismos de naturaleza bioquímica, se sospecha que son también causantes de la elevada tasa de supervivencia que se alcanza al añadir agentes crioprotectores. Tan sólo comentaremos a modo de ejemplo que ciertos agentes crioprotectores podrían estabilizar la membrana celular mediante interacciones electrostáticas con los fosfolípidos de ésta (Hammerstedt et al., 1990).

En resumen, los crioprotectores reducen la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada y por tanto la concentración de soluto durante la congelación y así la deshidratación celular. Esta reducción en la deshidratación celular hará que la célula no llegue nunca al volumen celular mínimo durante el proceso de congelación.

#### ASPECTOS PERJUDICIALES DE LOS CPAS

A pesar de los bien conocidos efectos beneficiosos de los agentes crioprotectores, éstos pueden ser muy dañinos, especialmente cuando son empleados en altas concentraciones. Los principales efectos dañinos son dos:

-Toxicidad: Los agentes crioprotectores son sustancias químicas que en condiciones normales no se encuentran en el interior de las células. Por ello, cuando atraviesan la membrana celular y se difunden por el medio intracelular, lo que realmente estamos haciendo es envenenar a la célula (Fuller et al. 2004). Sin embargo como el metabolismo celular está muy ralentizado, la acción tóxica de los crioprotectores se ve muy disminuida, salvo que empleemos muy altas concentraciones a temperaturas relativamente altas (en el entorno de los 0°C).

-Ósmosis: La adición de CPA ejerce per se un estrés osmótico sobre las células

porque aumentan la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los CPA y después se hidratan a la vez que el agua vuelve al interior celular junto con el CPA (permeable). Cuando el CPA permeable entra en la célula (lo hace más lentamente que el agua, debido a un mayor coeficiente de permeabilidad de la membrana al agua que al CPA), las células regresan a su volumen isotónico normal. Tras la eliminación del CPA permeable por dilución de la muestra tras la descongelación, el agua entra en las células rápidamente, debido al gradiente osmótico que se genera, y entonces el CPA sale de las células más lentamente; por lo tanto, las células se hinchan antes de alcanzar el equilibrio. Estos cambios en el volumen de la célula (contracción e hinchazón) pueden ser lo suficientemente grandes como para causar un daño celular irreversible. A la presión osmótica a partir de la cual se producen estos daños se le denomina "límite de tolerancia osmótica". Estos límites son únicos no sólo para cada tipo de celular, sino también para cada especie celular.

-Cambios en la permeabilidad al agua de la membrana plasmática: diferentes CPAs reducen la permeabilidad al agua en diversos grados, y así los espermatozoides se deshidratan más lentamente de lo esperado (Gilmore et al., 1995). El flujo de agua en la membrana es realizado por dos vías, por canales proteicos y a través de la bicapa lipídica. Por lo tanto, un CPA podría afectar la permeabilidad de la membrana en al menos tres maneras. Primero, el CPA podría modificar la bicapa lipídica, causando un cambio en su permeabilidad. Segundo, una modificación de la bicapa lipídica podría afectar indirectamente a la actividad transportadora de las proteínas de membrana. Tercera, el CPA podría interferir directamente con la función de las proteínas transportadoras de agua (principalmente a los canales específicos para el transporte de agua, o secundariamente a canales que son presumiblemente para transportar alguna otra molécula, como la glucosa, pero que además facilitan el transporte de agua).

## OTROS COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CRIOCONSERVACIÓN

### AGENTES QUE INTERACTÚAN CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El shock por frío esta probablemente relacionado con la transición de fase de la membrana lipídica, cuyos resultados son separación de las fases y la pérdida de permeabilidad selectiva. Diferentes sustancias han demostrado que pueden cambiar la composición lipídica de la membrana celular mejorando su fluidez. La adición de lecitina (de aceite de soja) o yema de huevo (que contiene fosfolípidos y lecitina) protege a la membrana espermática del shock por frío.

El mecanismo exacto por el cual estas sustancias protegen a la célula del shock por frío es desconocido. Parece que el responsable del efecto de la yema de huevo es una lipoproteína de baja densidad (LDL). Esta LDL puede actuar uniéndose directamente a la membrana y modificando su permeabilidad o activando a enzimas de la membrana (adenilato ciclasa, bombas iónicas,..) que mejorarían el comportamiento osmótico de las célula y la respuesta a crioprotectores permeables como el glicerol.

Además, el posible efecto beneficioso de algún detergente durante la congelación (SDS, etc.) se atribuye a que el detergente modifica las partículas de la yema de huevo (LDL) solubilizando lípidos, lo que facilita la interacción de éstos con la membrana plasmática.

Varios investigadores han proporcionado evidencia directa de que la Albúmina, en el medio de congelación se adhiere rápidamente a la membrana espermática en el momento de la dilución, modifica la composiciones lipídicas del espermatozoide mediante intercambio lipídico o hidrólisis, promueve la hidrólisis de las proteínas de membrana plasmática, causa la entrada de iones  $Ca^{2+}$  en el citoplasma, y disminuye el colesterol y la cantidad de fosfolípidos en la membrana plasmática del espermatozoide. Esta disminución del colesterol induce una mayor fluidez de membrana y por tanto

resistencia a la congelación. Otras sustancias con propiedades lipofílicas utilizadas para extraer colesterol de membranas, como el metil-beta-ciclodextrina (un derivado de un oligómero cíclico de la glucosa), también han demostrado mejorar la supervivencia espermática a la congelación.

### QUELANTES (EDTA, CITRATO)

Durante la criopreservación, existe un descontrol de la concentración de calcio intracelular. Este es probablemente el motivo para la inclusión del ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) y citrato en algunos diluyentes de semen; estos atraparían calcio y disminuirían el gradiente de concentración en toda la membrana plasmática del espermatozoide. Las concentraciones de calcio 0,1 mM. intracelulares son cuatro veces menores a las del ambiente exterior. El EDTA atrapa otros iones metálicos y podría también actuar inhibiendo la peroxidación de lípidos.

### AGENTES QUE EVITAN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Una serie de estudios han implicado a la peroxidación de los lípidos de membrana como causa de la función defectuosa del espermatozoide después de la criopreservación del semen (Salamon and Maxwell, 1995). Los intentos de superar la peroxidación durante la criopreservación de semen han incluido la realización del proceso bajo condiciones anaeróbicas, además de el uso antioxidantes y la inclusión de agentes quelantes. Confirmar la eficacia de estas estrategias ha sido algo problemático. Butirato hidroxitolueno, Glutation y Ditiotreitól han sido descritos como agentes protectores de la peroxidación durante criopreservación, con mejoras en la motilidad postdescongelación y la integridad acrosomal.

### BUFFER

Además de la elección del crioprotector y varios posibles aditivos, los diluyentes de semen deben estar preparados en un medio acuoso. Algunas formulaciones comúnmente utilizadas, especialmente

aquellas con alto contenido de azúcar, no contienen un buffer de pH por lo que componentes como yema de huevo puede afectar el pH la solución. Muchos medios incluyen citrato de sodio, TRIS (trisfosfato-(hidroximetil)-aminometano) o buffers zwitterionicos como TES (N-trisfosfato (hidroximetil)-metil-2-aminoetanosulponico ácido). No se debe utilizar tampón fosfato salino (PBS) como buffer en la congelación espermática, pues sus elevadas concentraciones de sodio, al alterarse las bombas Na-K durante el proceso de congelación, pueden ser perjudiciales para el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos intracelulares.

### VITRIFICACIÓN

La Vitricación es la solidificación de una solución alcanzándose el estado vítreo comentado anteriormente, sin formación de cristales. En este estado el agua se solidifica pero no se expande, esto sucede gracias a un rápido enfriamiento que conduce a un aumento extremo de la viscosidad sin formación de hielo intracelular. Este proceso es alcanzado por aumento tanto de la tasa de enfriamiento como de la concentración de la solución crioprotectora (Taylor et al., 2004).

De hecho aunque introdujéramos directamente una pajuela de congelación en nitrógeno líquido y después lo sumergiéramos en agua para calentarlo las tasas de enfriamiento y calentamiento serían del orden de  $>2500^{\circ}C/min.$ , lo que podría formar cristales de hielo intracelulares, y provocar daños en el espermatozoide. Para aumentar la velocidad de congelación se han utilizado otros dispositivos diferentes a la pajuela clásica que permiten un mayor contacto entre la suspensión celular y el nitrógeno líquido como rejillas de microscopia electrónica, semipajuela, cryoloop, cryotop, cryotip y cryoleaf (Fuller et al., 2004). Las tasas de enfriamiento y calentamiento pueden aumentar hasta  $30000^{\circ}C/min$  y  $42000^{\circ}C/min$  respectivamente, y así evitar con éxito la formación de hielo intracelular. Para conseguir esta alta tasa es necesario que el volumen donde están contenidos los espermatozoides sea muy pequeño (micras), lo que hace que el número de espermatozoides

vitrificados sea muy escaso, no siendo esta técnica útil para congelaciones de semen destinados a inseminación artificial o FIV sólo para ICSI.

La mayoría de los protocolos de vitrificación requieren una alta concentración de crioprotectores a fin de deshidratar rápidamente el espermatozoide y prevenir el hielo intracelular. Por lo tanto, la toxicidad de los crioprotectores debe ser considerada para el éxito de la congelación. En general, crioprotectores rápidos y permeables son preferibles porque la rápida permeabilidad acorta el tiempo de exposición, reduce la lesión tóxica y minimiza la hinchazón osmótica durante la eliminación de los crioprotectores. En vitrificación es muy importante durante el calentamiento eliminar el crioprotector rápidamente. Si las células están directamente expuestas a solución isotónica, existe un riesgo de hinchazón osmótica, porque el agua difunde más rápido al interior de la célula que la difusión al exterior del crioprotector desde el espermatozoide. La estrategia más común para evitar este daño es descongelar las células o de los embriones en una solución hipertónica que contiene agentes no-permeables para contrarrestar el exceso de flujo de agua. La sacarosa es utilizado usualmente para diluir las células vitrificadas después de la descongelación, actuando como una fuerza osmótica que restringe la permeabilidad del agua en las células, y así evitar "lesiones por hinchazón".

Sin embargo, se ha visto que los espermatozoides son capaces de recuperarse con técnicas de vitrificación sin adición de CPA, utilizando tasas muy altas de enfriamiento que podría depender en cierto grado de una alta permeabilidad innata de la membrana al agua (Isachenko et al., 2004) ó utilizando como único crioprotector la sacarosa (Hossain et al., 2007) ó el glicerol (Schuster et al., 2003). Por tanto, el papel de las técnicas de vitrificación de espermatozoides está todavía por aclarar.

## BIBLIOGRAFÍA

Merryman HT. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic

suspension as a cause of freezing injury. In: O'Connor GEW (ed.) *The Frozen Cell*. CIBA Foundation Symposium. Churchill Press, London 1970; 565-9.

Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, et al. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes — a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 1993; 265: 432-7.

Bailey JL, Robertson L, Buhr MM. Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca<sup>2+</sup> flux in bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci* 1994; 74: 53-8.

Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14: 251-72.

Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *RBM on line* 2004; 9: 680-91.

Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47: 347-69.

Rall W, Reid D, Farrant J. Innocuous biological freezing during warming. *Nature (London)* 1980; 286: 511-4.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 3-22.

Nei T. Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc* 1978; 112(2): 197-204.

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247, C125-C142.

Leibo SP, Farrant J, Mazur P et al. Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol. *Cryobiology* 1970; 6: 315-32.

Nei T. Mechanism of haemolysis of erythrocytes by freezing, with special reference to freezing at near-zero temperatures. In: Wolstenholme, G.E.W., O'Connor, M. Eds., *The Frozen Cell*. Churchill, London, 1970; 131-47.

Mazur P, Leibo SP, Farrant J, et al. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: Wolstenholme,

G.E.W., O'Connor, M. Eds., *The Frozen Cell*, London: Churchill; 1970 69-88.

Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953; 10(3): 414-26.

Karow AM Jr, Webb WR. Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 1965; 2(3): 99-108.

Nijs M, Ombelet W. Cryopreservation of human sperm. *Hum Fertil* 2001; 4: 158-63.

Gao D, Liu J, Liu C, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 1995; 10: 1109-22.

Gilmore JA, Liu J, Gao DY, et al. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa *Hum Reprod* 1997; 12: 112-8.

Lovelock JE, Polge C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J* 1954; 58: 618-22.

Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 1992; 29: 26-38.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11: 73-88.

Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 53: 985-995.

Taylor MJ, Song Y, Brockbank KG. Vitrification in tissue preservation: new developments. In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the Frozen State*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2004; 603-42.

Hossain AM, Osuamkpe CO. Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arc Androl* 2007;53:99-103.

Schuster TG, Keller LM, Dunn RL et al. Ultrarapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Hum Reprod* 2003;18:788-95.

# Introducing the G5 Series.™

Optimising embryo development  
in a protective in vitro environment.



The G5 Series.™  
Helping nature succeed.



[www.embiol.com](http://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](mailto:barcelona@embiol.com), [www.embiol.com](http://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](mailto:fertility@vitrolife.com)



## “TURISMO REPRODUCTIVO”, NO. “FLUJO DE PACIENTES”, SI.

Xavier Orriols y Montse Boada. Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

Según datos de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), en el año 2004 acudieron a España alrededor de 1000 pacientes para someterse a un tratamiento de reproducción asistida. Cuatro años más tarde, en el 2008, sólo en el I.U. Dexeus ya habíamos tratado a una cifra similar de pacientes extranjeras. Estos datos nos demuestran que los desplazamientos a otros países para someterse a tratamientos de reproducción asistida son un fenómeno que va en aumento, razón por la cual nos parece de enorme interés tratarlo en esta sección de Debate.

Lo primero que sorprende al ver el tema de debate es precisamente su título: Turismo reproductivo. No se puede negar el impacto de este titular al igual que otros generalmente empleados por los medios de comunicación como “Bebé medicamento” o “Niño probeta”. Desde nuestro punto de vista, la utilización de estos términos nos parece poco acertada y consideramos que en ámbitos de carácter científico deberíamos intentar utilizar una terminología más precisa y no caer en términos sensacionalistas, propios de la prensa general.

Utilizando la palabra turismo se relaciona un fenómeno de origen médico con el concepto de ocio. Es poco objetivo, además de poco riguroso y se aleja del verdadero sentido de la cuestión. Creemos que ésta no es la mejor manera de corregirlo y además puede llevar a que una parte de la sociedad tenga una percepción equívoca sobre esta cuestión. Por ello, cuando en el Máster de Biología de la Reproducción debatimos este tema, lo primero que hicimos fue pensar en nombres alternativos que se ajustaran más a la realidad, como por ejemplo Flujo de pacientes entre países para TRA. Del mismo modo, la ESHRE lo denomina Cross-border reproductive care, el cual está en consonancia con el

término usado por la comunidad médica Cross-border health care.

Teniendo en cuenta la repercusión que ha tenido la salida de pacientes en países como Italia, que han visto disminuir considerablemente el número de ciclos realizados por su situación legal particular, podemos entender que estos países mantengan una actitud crítica e incluso contraria al flujo de pacientes hacia otros países como España. Si lo que queremos es evitar la oposición de la UE y sociedades como la ESHRE tendríamos que intentar no captar a las pacientes con paquetes turísticos u otra publicidad meramente comercial. Campañas publicitarias que complementan el tratamiento médico con otras actividades lúdicas como visitas a parques de atracciones, golf, rutas culturales, etc., frivolan quizá la imagen de nuestros centros de TRA, cuyo alto nivel científico y técnico es indiscutible.

Si como ya hemos dicho no existe ninguna razón médica, científica o técnica que desaconseje dichos desplazamientos, y aceptamos que cualquier paciente tiene derecho a ser tratada y a escoger el centro donde quiere hacerlo, no debería existir pues regulación alguna que los limitara.

En conclusión, las pacientes deberían escoger el centro de TRA por cuestiones médicas y no por otros motivos. Las razones legales no deberían ser el motivo del desplazamiento. Si existiera una legislación única, esto no sucedería. Sin embargo, dado que esto es una utopía y las diferencias legales entre países seguirán existiendo, lo que debemos intentar es ofrecer el mejor trato posible y la máxima calidad científica. Estas deberían ser las verdaderas razones por las que pacientes extranjeras escogieran nuestros centros y no los atractivos paquetes turísticos con los que en algunos casos se intentan captarlas.

## REPRODUCTIVE TOURISM

Bonnie Collins. Laboratory Manager. Centre for Reproductive Medicine, St Bart's Hospital. London

In some ways very little has changed in IVF laboratories since I started working as a clinical embryologist in London back in 1991. But in the UK what can at times seem like an ever increasing regulation of clinics by the HFEA has ensured that we have not stood still in terms of compliance with the changes in the European legislation of ART.

But for me the greatest change, and so impact on the way we work in the UK, came about following changes in the use of donor gametes after the implementation of requirements set out in the SEED report. The use of iD release (non-anonymous) gamete donors here in the UK is now the norm. Our fears that there would be fewer sperm donors available was seen initially and led many of our patients to apply to import samples from overseas. This process was halted for a few months when the HFEA stopped all applications to import from outside of the UK due to an issue over how gamete donors were being 'reimbursed', or 'paid'.

The limitations placed upon the movement of patients' own gametes and embryos between the European states being dependent upon the readiness of each member state to have ensured that clinics had introduced the regulation as per the EUTD by the named governing bodies responsible for their compliance, has made it a more complicated process despite the perceived increased openness within the EU.

For patients seeking treatment with donated oocytes, the access to clinics in Eastern Europe led to an alleviation in the length of time waiting for access to the chance to become pregnant. But at what cost? And what really concerned me? The overseas clinics I have had the pleasure to work with have been both professional and successful in producing the end product. A take-home baby. But in the UK where we are currently all working towards reducing the rate of

multigestations, particularly where donor oocytes are involved. I was concerned that where in the UK a maximum of two embryos could be replaced that our patients could have three replaced. This means an increased chance of a twin or triplet pregnancy and the costs and risk of such a pregnancy would need to be met here in the UK by the system we were trying to reduce them in. With the added complication of the mother being of advanced maternal age in many cases where a singleton pregnancy would be classed as a 'high risk'. Patient fixation on getting pregnant at any cost, financial or clinical, could endanger their chance of actually taking home a baby or increasing the risk of a pre-term delivery in addition to the risk of disability.

But what of the cost to the patients? The stress of traveling to another country, where the first spoken language may not be their own. That ART provision delivered differently due to that country's enforcement of the law and regulation, make the treatment a more difficult experience?

I have often wondered whether the changes to the laws within the UK with regards to the anonymity status of donors was meant to reduce the number of children born following such treatment? Or that our obsession in the UK to consider the welfare of the unborn child has led us to increase the pressure on altruistic donors and those who receive limited reimbursement for donating to ensure that any resulting child is able to trace his genetic parent once they are 18 years of age. The limit on reimbursement here in the UK whilst being seen as morally correct in many peoples eyes appears less than honest when compared to the straight 'cash for gametes' in place overseas. Can this reproductive tourism be taken as in the words of Professor Guido Pennings as merely a 'safety valve', so allowing those seeking these treatments the personal

freedom and cheaper and more immediate access to the services they require in order to become parents that they may not be eligible for in their own country.

What role should UK clinics play in the search for treatment overseas, if any? As once involved they are duty bound to try and extend our tight regulations overseas. But with all things considered should it not be a personal decision as to where and how a patient achieves their dream of becoming a parent?

## FLUJO DE PACIENTES ENTRE PAÍSES. ¿QUÉ SABEMOS DE ELLO?

Marta Tresanchez y Montserrat Boada. Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

El desplazamiento de pacientes entre países para acceder a técnicas de reproducción asistida es un fenómeno que en los últimos años ha ido en aumento y en la mayoría de los casos originado por las distintas normativas que rigen en cada país. A menor escala, también podríamos considerar que existe el mismo fenómeno entre las distintas comunidades autónomas de nuestro país que a pesar de compartir una misma legislación tienen diferencias debido a que las competencias de sanidad están transferidas a las CCAA y el acceso a determinadas técnicas o las ayudas económicas a los tratamientos pueden ser distintas.

Legislaciones restrictivas como las de Italia y Alemania, o cambios en las leyes como en el caso del Reino Unido, en relación al anonimato de las donaciones, están provocando que muchas parejas vengan a España en busca de tratamientos prohibidos en su país de origen. A pesar de que España es uno de los países que más pacientes extranjeras recibe debido al carácter progresista de nuestra legislación, otros países también son destinatarios de estas pacientes.

Es indiscutible que el flujo de pacientes para TRA genera un gran negocio para los centros receptores, pero no hay que olvidar que esta situación puede variar en el momento en que se produzca un nuevo cambio normativo. Sin ir más lejos, el pasado mes de Abril la Corte Constitucional Italiana declaró la "ilegitimidad constitucional" de algunos puntos de la Ley italiana de TRA. Todavía no sabemos qué medidas tomará el gobierno italiano al respecto, y si se modificará sustancialmente la ley pero en caso afirmativo se reduciría significativamente el número de pacientes que se desplacen a nuestro país.

Un punto importante a tener en cuenta es el esfuerzo personal y económico que

les supone a estas pacientes. Las TRA representan una fuente de estrés en sí mismas para la mayoría de los casos y esto se ve acentuado cuando se desplazan a otro país donde ni conocen la lengua, ni el centro, ni tienen un soporte familiar adecuado. Los problemas laborales que pueden derivarse debido a los tratamientos en el extranjero pueden ser muy graves y llegar a provocar la pérdida del empleo. Todas estas dificultades pueden llegar a ocasionar repercusiones a nivel psicológico: estrés, frustración, baja autoestima, problemas de pareja, etc. Facilitarles la comunicación en su misma lengua y disponer de un servicio de atención al paciente internacional así como de un servicio de apoyo psicológico especializado conseguirán disminuir los efectos adversos.

Para las pacientes que se desplazan a otros países el coste económico de un tratamiento de TRA es mucho más elevado que si lo realizaran en su país de origen. ¿Está pues el flujo de pacientes discriminando a favor de las parejas con un nivel socio-económico más alto? ¿Qué pasa con las parejas que no se pueden permitir un gasto así? ¿Esta situación vulnera el Principio de Igualdad? Recientemente se ha detectado un incremento del flujo de pacientes hacia países del Este u otros destinos como la India donde el acceso a las TRA es económicamente mucho más asequible pero en los que la calidad y el rigor científico no siempre están garantizados. La falta de información verídica sobre los centros a los que pueden dirigirse o en ocasiones la elección preferencial por determinados centros (no siempre los mejores) recomendados por su ginecólogo, puede vulnerar también el Principio de Autonomía y de Beneficencia.

En resumen, teniendo en cuenta las grandes dimensiones que ha adquirido el flujo reproductivo en los últimos años y las múltiples implicaciones éticas y

psicológicas que se derivan de él, consideramos que un análisis profundo de la situación nos daría a conocer con exactitud el volumen que representa, las condiciones en las que se realiza y nos permitiría mejorarlas para garantizar una buena praxis. No creemos que sea necesario regularlo legalmente pero si consideramos que las sociedades científicas especializadas deberían registrar estos casos y realizar un seguimiento de ello.



Pedidos sin  
calendario  
y entregas  
en las 24/48 h

NUESTRA LÍNEA  
DE PRODUCTOS :

## BioCare Europe

es una empresa que actúa exclusivamente  
en el sector de la reproducción asistida.

Desde 1997 brinda a los especialistas  
de este sector un servicio con un perfil  
muy profesional y especializado.

BioCare Europe es especializada  
en el abastecimiento de material de consumo,  
medios de cultivo, micropipetas,  
agujas de punción y placas de Nunc



**REPROLINE**

*medical*



**NUNC™**

**HUNTER  
SCIENTIFIC  
LIMITED**

 **BioCare**  
EUROPE

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

[ifo@biocareeurope.com](mailto:ifo@biocareeurope.com)

Tel. +39.06.44.24.03.41

Fax +39.06.44.24.03.58

Número Verde desde España:

900993936



## COMITÉ DE HONOR:

• Con fecha 6 de febrero, el Excmo. Sr. D. Bernat Soria, Ministro de Sanidad y Consumo, aceptó formar parte del Comité de Honor del V Congreso Nacional ASEBIR. Estamos a la espera de la aceptación de la Excm. Sra. Dña. Trinidad Jiménez García-Herrera, actual titular del Ministerio de Sanidad y Política Social del Gobierno de España.



## COMITÉ ORGANIZADOR

### PRESIDENTA

• Dra. M<sup>a</sup> José de los Santos

### VOCALES

• Dra. Carmela Albert  
• Dra. Pilar Buendía  
• Dra. Juana Crespo  
• Dr. José M<sup>a</sup> de los Santos  
• Dra. Arancha Delgado  
• Dra. Blanca Gadea  
• Dra. Arancha Galán

• Dra. Pilar Gámiz  
• Dra. Noelia Grau  
• Dra. Emilia Mateu  
• Dra. Amparo Mercader  
• Dra. Amparo Mifsud  
• Dr. Miguel Milán  
• Dr. Antonio Pellicer  
• Dra. Amparo Ruiz  
• Dr. Alberto Tejera  
• Dra. Tamara Viloria  
• Dr. Jesús Zulategui

## COMITÉ CIENTÍFICO

• Dra. Begoña Arán  
• Dra. Montserrat Boada  
• Dra. Ana Cobo  
• Dra. Nieves Cremades  
• Dr. Jorge Martín Cuadros  
• Dra. M<sup>a</sup> José Escribá  
• Dr. Nicolás Garrido  
• Dr. Julio Martín  
• Dr. Marcos Meseguer

• Dra. Inmaculada Molina  
• Dr. Joaquín Moreno  
• Dra. Sonia Pérez  
• Dra. Lorena Rodrigo  
• Dr. Josep Lluís Romero  
• Dra. Carmen Rubio  
• Dra. María Vila

### SECRETARÍA ASEBIR

Telf.: +34 91 367 89 94

E-mail: asebir@asebir.com

### SECRETARÍA TÉCNICA DEL CONGRESO

Grupo Process

Telf.: +34 91 377 14 23

E-mail: Vcongreso@asebir.com

---

# Programa Científico Preliminar

---

## **MIÉRCOLES, 25 DE NOVIEMBRE DE 2009**

### **TARDE**

15:00 - 20:00 hrs. Apertura de secretaría y colocación de Pósters.

16:00 - 17:00 hrs. Inauguración oficial del V Congreso Nacional ASEBIR.

17:00 - 19:30 hrs. Grupos de Interés ASEBIR.

Moderadora: M<sup>a</sup> José Figueroa (Cádiz) - Inmaculada Molina (Valencia).

17:00 - 17:30 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Calidad Embrionaria. Actualización de la clasificación de ASEBIR.

Ponente: Jorge Martín Cuadros (Clínica FIV, Madrid)

17:30 - 18:00 hrs. Creación del tercer Cuaderno de Embriología "Afianzamiento de calidad: aspectos técnicos y aspectos biológicos".

Ponente: Manuel Ardoy (H. Univ. Gregorio Marañón, Madrid)

18:00 - 18:30 hrs. Indicadores Laboratorio de Embriología Clínica.

Ponente: Juan Manuel Moreno (Clínica Vistahermosa, Alicante)

18:30 - 19:00 hrs. Estado actual de Grupo de Interés de DGP.

Ponente: Esther Fernández (GENIALITY, Madrid)

19:00 - 19:30 hrs. Registros SEF.

Ponente: José Antonio Castilla (H. U. Virgen de las Nieves, Granada)

20:30 hrs. Cocktail Inaugural en el Palacio de Congresos.

---

## JUEVES, 26 DE NOVIEMBRE DE 2009

### MAÑANA

08:00 - 14:00 hrs. Apertura de secretaría y colocación de Pósters II.

09:00 hrs. Apertura mesa electoral ASEBIR.

09:00 - 11:00 hrs. Sesión Embriología.

Moderadores: Amparo Ruiz (Valencia) - María Bonada (Londres).

09:00 - 09:40 hrs. Ponencia I: Requisitos del laboratorio de embriología clínica: Implicaciones de la transposición de las Directivas Europeas.  
Ponente Dra. Cristina Magli (Clínica SISMER, Bologna).

09:40 - 10:20 hrs. Ponencia II: Manejo de pacientes con enfermedades infecciosas en laboratorio de Reproducción Asistida. ¿Representa realmente un riesgo en el laboratorio?  
Ponente Dr. Fernando Marina (I. de Reproducción CEFER, Barcelona)

10:20 - 11:00 hrs. Ponencia III: Métodos no invasivos de evaluación de la calidad embrionaria. Respirometría.  
Ponente Dra. Lynette Scott (Reading, MA, USA)

11:00 - 11:30 hrs. Pausa café.

11:30 - 13:10 hrs. Comunicaciones Orales. (10)

Moderadores: M<sup>a</sup> José Escribá (Valencia) - Ezequiel Pérez Campos (SEC).

13:10 - 13:55 hrs. Simposium Satélite. EMB.

14:00 - 16:00 hrs. Comida congresual.

### TARDE

15:00 - 19:30 hrs. Apertura de secretaría.

16:00 - 17:20 hrs. Sesión Andrología.

Moderadores: Miguel Ruiz (Valencia) - Ferran García (ASESA).

16:00 - 16.40 hrs. Ponencia I: Marcadores moleculares de calidad espermática.  
Ponente. Dr. Marcos Meseguer (IVI, Valencia).

16:40 - 17:20 hrs. Ponencia II: Integridad del ADN espermático y su efecto sobre la calidad embrionaria. ¿Es clínicamente útil?  
Ponente Dr. Jorge Ten (Instituto Bernabeu, Alicante)

17:20 - 18:20 hrs. Sesión de Pósters.

18:00 hrs. Cierre mesa electoral ASEBIR.

18:20 - 20:00 hrs. Comunicaciones Orales. (7)

Moderadores: Joaquín Moreno (Valencia) - Nieves Cremades (Alicante).

**VIERNES, 27 DE NOVIEMBRE DE 2009****MAÑANA**

08:00 - 14:00 hrs. Apertura de secretaría.

08:30 - 10:30 hrs. Sesión Genética y Reproducción.

Moderadores: Begoña Arán (Barcelona) - Carmen Rubio (Valencia).

08:30 - 09.10 hrs. Ponencia I: Uso de Microarrays en Diagnóstico Genético Preimplantacional

Ponente: Carles Giménez (Reprogenetics Spain, Barcelona).

09:10 - 09:50 hrs. Ponencia II: Qué nos aporta el análisis genético en espermatozoides en la pareja infértil.

Ponente Dr. Joan Blanco (UAB, Barcelona)

09:50 - 10:30 hrs. Ponencia III: Infertilidad y genética: Producción de gametos a partir de células madre embrionarias.

Ponente Dra. Anabel Marqués (C. de Investigación Príncipe Felipe, Valencia)

10:30 - 11:00 hrs. Pausa café.

11:00 - 11:50 hrs. Comunicaciones Orales. (5)

Moderadores: Montserrat Boada (Barcelona) - Ana Monzó (SEF)

11:50 - 12:35 hrs. Simposium Satélite. MediCult.

12:35 - 14:00 hrs. ASAMBLEA ASEBIR

14:00 - 16:00 hrs. Comida congresual

**TARDE**

15:00 - 19:30 hrs. Apertura de secretaría.

16:00 - 16.40 hrs. Sesión Aula Virtual

Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza (Sevilla) - Jesús Zulategui (Valencia)

Uso y aplicación de clínica de la luz polarizada en Reproducción

Ponente: Gemma Arroyo (Institut Universitari Dexeus, Barcelona).

16:40 - 17:20 hrs. Sesión Debate

Moderadores: Victoria Hurtado de Mendoza (Sevilla) - Jesús Zulategui (Valencia)

Mitos y Leyendas en el laboratorio de Embriología Clínica: Efecto perjudicial de la luz del laboratorio sobre los embriones humanos.

Ponentes: Dr. Antonio Urries (Clínica Quirón, Zaragoza). Dr. Emilio Gómez (TAHE Fertilidad, Murcia).

17:20 - 17:40 hrs. Pausa café.

17:40 - 17:55 hrs. Premio IVI al Mejor Póster 2009 (Auditorio III - Sala Póster)

Dra. Amparo Ruiz (IVI, Valencia)

17:55 - 18:00 hrs. Anuncio de los Premios ASEBIR - EMB 2009

Sergio Oliveró (Dir. Gral. Grupo EMB) - M<sup>a</sup> José de los Santos (Pta. Comité Organizador)

18:00 - 19:00 hrs. Comunicaciones Orales. (6)

Moderadores: Arancha Galán (Valencia) - Jorge Ten (Alicante).

19:00 - 19:30 hrs. Exposición Premios ASEBIR-EMB 2007

Moderadores: Mark Grossman i Camps (Pte. ASEBIR) M<sup>a</sup> José de los Santos (Pta. Comité Organizador)

19:00 - 19:15 hrs. Premio ASEBIR-EMB de Investigación Básica 2007 "Incidencia de anomalías epigenéticas de los loci H19 y SNRPN en espermatozoides de individuos que consultan por problemas de fertilidad"

Ponente: Dra. Marta Pladevall Sierra (UAB, Barcelona)

19:15 - 19:30 hrs. Premio ASEBIR-EMB de Embriología Clínica 2007 "Eficacia de la vitrificación de embriones: resultados en CREA tras dos años de experiencia"

Ponente: Dra. Empar Ferrer Robles (CREA, Valencia)

19:30 - 20:00 hrs. Clausura V Congreso de ASEBIR 2009 por parte del Dr. Mark Grossmann, Presidente de ASEBIR y la Dra. M<sup>a</sup> José de los Santos, Presidenta del Comité Organizador.

21:30 hrs. Cena de Clausura y entrega de los Premios ASEBIR-EMB 2009



Somos los primeros  
en conocerte ...

... y sabemos que  
crecerás sano

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

## SERVICIOS

### Servicio de diagnóstico genético preimplantacional: ovocitos y embriones

- Estudio de aneuploidías
- Estudio de reorganizaciones cromosómicas
- Estudio de enfermedades monogénicas

### Estudio genético del factor masculino

- FISH en espermatozoides
- Test de Fragmentación del DNA en espermatozoides
- Microdeleciones del cromosoma Y

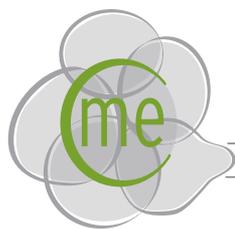
### Otros servicios

- Biopsia y fijación de blastómeros
- Biopsia y fijación de corpúsculo polar
- Consejo genético
- Formación en las técnicas de biopsia y fijación

## I WORKSHOP DE BIOPSIA Y FIJACIÓN DE CORPÚSCULO POLAR

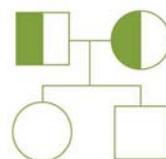
Período de realización:  
Grupo I : 22 de Septiembre  
Grupo II : 23 de Septiembre

[plazas limitadas]



centro de medicina  
embrionaria

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



Reproductive  
Genetic  
Institute

Chicago - USA

CME Madrid - Medea, 4 · 3ºD Edificio ECU. 28037 Madrid - Tf. 91 411 50 80 - Fax 91 411 50 81

CME Barcelona - Trias i Pujol, 5. 08034 Barcelona - Tf. y Fax 93 280 40 28

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

## PAPEL DE LOS FACTORES SOLUBLES EN FOLICULOGÉNESIS *THE ROLE PLAYED BY SOLUBLE FACTORS IN FOLLICULOGENESIS*

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

<sup>1</sup> Clínica de Medicina de la Reproducción y Ginecología, FivMadrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Unidad de Genómica, Parque Científico, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

Correspondencia: Paloma Sánchez-Aparicio, [aparicio@fivmadrid.es](mailto:aparicio@fivmadrid.es)

Financiación: Este trabajo ha sido financiado en su totalidad por la Fundación FivMadrid

### RESUMEN

La foliculogénesis es el proceso de crecimiento y maduración folicular que culmina con la ovulación. Este proceso está sujeto a complejos mecanismos de regulación endocrina, autocrina y paracrina que conjuntamente garantizan la formación de oocitos maduros. En este contexto, los factores solubles desempeñan un papel clave actuando de forma coordinada con los mecanismos de comunicación e interacción celular. En este trabajo llevamos a cabo una revisión exhaustiva de aquellos mediadores solubles que están involucrados en el proceso de la foliculogénesis.

**Palabras Clave:** hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, foliculogénesis

### SUMMARY

The folliculogenesis is the process of follicular development and maturation which leads to ovulation. This process is subject to complex mechanisms of endocrin, autocrin and paracrin regulation which all together ensure the formation of mature oocytes. In this context, soluble factors play a key role, operating in a coordinated fashion with the mechanisms of cell communication and interaction. In this work we review in detail those soluble factors involved in the process of folliculogenesis.

**Key Words:** hormones, growth factors, cytokines, folliculogenesis

### REGULACIÓN ENDOCRINA, AUTOCRINA Y PARACRINA DEL OVARIO

Los ovarios, son los órganos portadores de la línea germinal y se caracterizan por la sencillez de su arquitectura tisular pese a su complejidad funcional; están constituidos por un estroma medular central y una región cortical periférica en la que se disponen los folículos ováricos.

Los folículos ováricos están en continuo cambio durante la vida reproductiva de la mujer y evolucionan desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo maduro. Los folículos primordiales quedan constituidos en el periodo prenatal y están formados por una célula germinal rodeada de una capa de células somáticas planas.

Por tanto, a nivel celular, el ovario está formado por células germinales y por células somáticas de funcionalidad diversa que incluyen células epiteliales y células estromales.

Estas últimas se clasifican en células de tejido conectivo y células productoras de hormonas. Todas ellas establecen procesos de interacción y adhesión celular con otras células vecinas y/o con los componentes de la matriz extracelular (MEC).

La MEC forma un entramado de proteínas, secretado por las propias células del entorno, que se disponen entre las células del folículo y forman parte de la lámina basal. Además, algunas proteínas de MEC se encuentran en suspensión en el líquido folicular.

Todo ello da lugar a un soporte celular adecuado que garantiza una arquitectura tisular óptima para el desarrollo de gametos femeninos funcionales.

Aunque la función principal del ovario es la producción de oocitos maduros, desempeña además, una función endocrina adicional mediante la producción de hormonas esteroideas que, a su vez, juegan un papel esencial en la generación de oocitos por parte del propio ovario (revisado en Oktem and Oktay, 2008).

La actividad del ovario es cíclica y está bajo el control del eje hipotálamo-hipofisario. Por tanto, la función del ovario está sujeta a regulación endocrina, a través de dos hormonas

hipofisarias: la FSH (hormona folículo estimulante) y la LH (hormona luteinizante). Estas dos hormonas están directamente implicadas en el crecimiento y la diferenciación folicular y su papel estimulador sobre el ovario garantiza la producción de hormonas esteroideas (progesterona, estradiol) que, a su vez, ejercen un efecto feedback sobre la hipófisis (revisado en Palermo, 2007).

Durante las etapas iniciales de un ciclo ovárico, la producción de hormonas esteroideas está disminuida, haciendo posible la liberación de FSH. Esta hormona estimula el crecimiento folicular, y la presencia adicional de la hormona LH hace posible la producción de hormonas esteroideas por parte de dichos folículos. Cuando el nivel de la hormona esteroidea estradiol se ve aumentado, se produce un efecto feedback negativo sobre la producción de gonadotropinas hipofisarias. Sin embargo, cuando se llega a alcanzar un nivel crítico de estradiol, este efecto feedback negativo cesa. Comienza entonces un efecto feedback positivo, que permite alcanzar un pico máximo de concentración de la hormona LH. Esta elevación de LH es la inductora final de la ovulación.

Además de la regulación endocrina descrita, el ovario dispone de sistemas de regulación locales; algunas células especializadas producen factores que participan en el control de células vecinas de la misma gónada (regulación paracrina), al igual que las secreciones generadas por otras células permiten la autorregulación (regulación autocrina). Estos factores intra-ovario son capaces de modular, amplificando o atenuando, la acción hormonal sobre el propio ovario.

Aunque la regulación funcional del ovario está controlada fundamentalmente por las gonadotropinas hipofisarias, los elementos paracrinos y autocrinos participan en el complejo entramado de factores que hacen posible el desempeño de la función ovárica.

## FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis es el proceso de crecimiento y maduración folicular que

culmina con la ovulación y permite la formación de oocitos maduros. Este proceso garantiza la producción de células especializadas de forma única para transmitir el genoma a generaciones sucesivas. Por tanto, la meiosis constituye un mecanismo obligado que garantiza la constitución de gametos haploides a partir de células germinales diploides.

Durante el desarrollo embrionario, los folículos primordiales quedan constituidos, iniciándose este proceso hacia la semana 16 de la vida fetal, y finalizando antes de terminar la gestación. Estos folículos están formados por un oocito detenido en la profase de la primera división meiótica, rodeado por una capa única de células planas de la granulosa y una membrana basal que aísla el conjunto del tejido adyacente.

Estudios llevados a cabo con animales experimentales demuestran la implicación de un factor clave e imprescindible en el proceso de constitución de los folículos primordiales. Se trata del factor de transcripción específico de oocitos FIG (factor de la línea germinal) (Soyal et al., 2000). Este factor determina el perfil de expresión génica propia del ovocito y controla la regulación transcripcional de aquellos genes implicados en la iniciación del desarrollo folicular, así como otros relacionados con la formación de la zona pelúcida (Dean, 2002).

Por tanto, al nacer, el ovario dispone de una población finita de folículos primordiales que permanecen en estado quiescente durante un periodo de tiempo extenso. Una vez alcanzada la edad reproductiva, un número determinado de folículos primordiales reciben la señalización adecuada que les hace abandonar su estado de reposo y entrar en fase de crecimiento y diferenciación celular. El destino de la mayor parte de los folículos reclutados en este proceso es la apoptosis, y sólo unos pocos llegan a competir por ser el folículo dominante. El tiempo estimado hasta alcanzar la ovulación a partir de un folículo primordial es aproximadamente de 90 días.

Durante el desarrollo folicular, los folículos primordiales evolucionan y dan lugar a los folículos primarios. Estos últimos están constituidos por un oocito que permanece detenido en la profase de la primera división meiótica, y está rodeado por una capa de células de la granulosa que han cambiado su morfología y presentan ya un aspecto cúbico (Fortune et al., 2000).

En esta fase se establecen uniones intercelulares tipo gap junctions entre las células de la granulosa y entre estas últimas y el oocito. Estas uniones establecen una comunicación citoplasmática directa entre células adyacentes que permite el intercambio de nutrientes, metabolitos y pequeñas moléculas mediadoras. La señalización resulta ser bidireccional, de forma que las células de la granulosa producen sustancias que mantienen el oocito detenido en meiosis y, simultáneamente, el oocito libera factores que controlan el crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa circundantes (Gershon et al., 2008).

A continuación, las células de la granulosa entran en mitosis sucesivas y van disponiéndose en capas concéntricas que están separadas del resto de las células estromales por la lámina basal. Cuando el número de capas concéntricas es superior a tres, las células estromales circundantes se diferencian y reciben el nombre de teca interna. A su vez, las más alejadas, en contacto directo con la lámina basal, se llaman teca externa. El folículo recibe, entonces, la denominación de folículo secundario.

El proceso de crecimiento folicular descrito hasta ahora es independiente de la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias. Por tanto, estas etapas iniciales no están sujetas a regulación endocrina. Este patrón de crecimiento cambia cuando las células de la granulosa de algunos folículos empiezan a expresar receptores de membrana para la hormona FSH. De este modo, una cohorte de folículos responde a la estimulación inducida por esta hormona. Este momento se asocia a un incremento de los niveles de FSH subsiguientes a la disminución de la

producción de hormonas esteroideas por parte del ovario.

En su evolución, el oocito aumenta de tamaño y se rodea de la zona pelúcida, las células de la granulosa continúan proliferando y aumentando el número de capas, y la teca sigue organizándose a partir de las células estromales.

Las células de la granulosa expresan ya un número considerable de receptores para la hormona FSH. La proliferación celular pasa a ser dependiente de FSH, y esta hormona se convierte en la responsable de la producción creciente de estrógenos por parte de las células de la granulosa. A su vez, la FSH actúa de forma sinérgica con los estrógenos, promoviendo un aumento del número de receptores de la FSH y estimulando la proliferación celular.

Sin embargo, es la presencia precoz de estrógenos en el entorno folicular lo que hace posible que los folículos sean capaces de responder a cantidades reducidas de FSH. Este mecanismo justificaría la acción autocrina de los estrógenos en el ovario. Además, aunque sólo algunas células expresen en su membrana receptores para FSH, la cascada de señalización activada puede propagarse a otras células adyacentes, vía los canales intercelulares de las gap junctions, haciendo posible la sincronización del comportamiento celular dentro del folículo.

Simultáneamente al cambio experimentado por las células de la granulosa foliculares, las células del estroma ovárico continúan con su proceso de diferenciación y organización. Las células situadas alrededor de la membrana folicular, envolviendo las células de la granulosa, generarán la teca interna, y la capa de células más alejadas, con incipiente vascularización, generarán la teca externa. Cuando las células de la capa interna de la teca se especializan definitivamente se habla de folículos preantrales.

Además, en los folículos preantrales, como consecuencia de la acción sinérgica FSH/estrógenos, se produce la acumulación de líquido folicular en los espacios intercelulares de la granulosa. El líquido folicular termina por

acumularse en un espacio único denominado antrum, que divide las células de la granulosa en dos poblaciones distintas, espacial y funcionalmente. Las células más próximas al oocito se denominan células del cúmulo y aquellas que se encuentran delimitando la pared del antrum se llaman células de la granulosa murales. El líquido folicular acumulado permite la perfecta nutrición del oocito y las células del cúmulo. Una vez que la cavidad del antrum ha quedado completamente definida, se habla de folículos antrales. Estos últimos continúan su evolución aumentando de tamaño y recibiendo nutrientes y suplementos a través de los capilares sanguíneos que irrigan la teca.

Finalmente, un único folículo alcanza el estadio de madurez y la superficie del ovario, teniendo lugar la ovulación. Este proceso está mediado por los niveles elevados de la hormona LH, que conduce a la finalización de la primera división meiótica del oocito y a la liberación del primer corpúsculo polar, y al inicio inmediato de la segunda división meiótica. Sin embargo, la finalización de la segunda división meiótica y la expulsión del segundo corpúsculo polar sólo tendrá lugar si existe fecundación del oocito por un espermatozoide. Los restos foliculares tras la ovulación sufrirán ciertas modificaciones inducidas por la LH, dando lugar a la formación del cuerpo lúteo.

## FACTORES SOLUBLES

Los factores solubles son elementos bioactivos, de pequeño tamaño y naturaleza proteica, que ejercen su acción biológica a través de receptores de membrana expresados en las células diana. Estos factores son sintetizados por diferentes tipos celulares y actúan como comunicadores químicos entre células y tejidos.

Estos factores son pleiotrópicos y desempeñan un papel relevante en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. El grupo de factores solubles incluye, entre otros, las citoquinas, los factores de crecimiento y las hormonas.

Las citoquinas constituyen una familia

de glicoproteínas hidrosolubles, muy diversas en origen y función, que desempeñan un papel clave en la comunicación celular. Esta familia engloba las linfoquinas, las interleuquinas y las chemoquinas. Cada citoquina se une a su receptor de membrana, activando una cascada de señalización intracelular que alcanza el núcleo y termina por activar o silenciar la expresión de determinados genes. Se caracterizan por su considerable redundancia, pudiendo actuar sobre la propia célula que las secreta (acción autocrina), sobre las células vecinas (acción paracrina), o sobre células de regiones dístales que alcanzan vía plasmática (acción endocrina).

Los factores de crecimiento son péptidos secretados por distintos tipos celulares, que ejercen su función biológica como señalizadores extracelulares, estimulando la proliferación de sus células diana. Dichas células deben expresar el receptor específico para poder responder a determinado factor de crecimiento que ejerce su función de forma autocrina o paracrina.

Las hormonas son sustancias que desarrollan su acción biológica en un número considerable de procesos que incluyen la reproducción y la diferenciación sexual. Una sola hormona puede desarrollar varias funciones, y cada función puede ser controlada por varias hormonas. La acción de las hormonas siempre tiene lugar a través de receptores específicos expresados en las células diana, y su efecto varía según su patrón de expresión y concentración.

La naturaleza de las hormonas es variable dependiendo de su origen, pudiendo derivar de amino ácidos, colesterol o fosfolípidos. Las más abundantes son las hormonas proteicas como la FSH, la LH y la TSH, seguidas de las derivadas del colesterol como las hormonas esteroideas, producidas por la corteza adrenal y las gónadas.

Las hormonas de naturaleza proteica dependen de la expresión génica inmediata, mientras que las derivadas del colesterol requieren más bien de la presencia de enzimas específicas capaces de convertir el colesterol en el esteroide apropiado. Esta últimas son

menos solubles en agua que las primeras, de forma que circulan unidas a una proteína transportadora tipo albúmina o globulina plasmática.

El tercer grupo de hormonas son aquellas derivadas de la tirosina o el triptófano; una simple molécula de tirosina produce catecolaminas, epinefrina y norepinefrina.

## FACTORES SOLUBLES IMPLICADOS EN LA FOLICULOGÉNESIS

Las etapas iniciales del proceso de la foliculogénesis son independientes de la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias y, sin embargo, dependen de los factores autocrinos y paracrinos producidos localmente dentro del ovario o incluso en el propio folículo. La bidireccionalidad de la señalización oocito-células somáticas circundantes resulta esencial para la funcionalidad de ambos tipos celulares.

Durante la etapa reproductiva, los folículos primordiales reciben la estimulación adecuada y abandonan su estado de quiescencia. Las células de la granulosa adquieren morfología cuboidal y se habla de folículos primarios. A continuación, entran en intensa actividad mitótica y se van disponiendo en capas concéntricas alrededor del oocito. Se habla entonces de folículos secundarios.

Aunque los mecanismos precisos que inician el proceso de desarrollo y diferenciación de los folículos primordiales no se han establecido con exactitud, hasta la fecha se ha descrito la implicación de tres factores intra-ovario:

**Hormona anti-mülleriana (AMH).** Sustancia producida por las células de la granulosa, con un papel esencial en el desarrollo folicular inicial. El nivel sérico de AMH se correlaciona con el número de folículos en el ovario, y algunos autores han sugerido la utilidad de la AMH como marcador de la reserva ovárica en casos de subfertilidad asociada a edad avanzada (Broekmans et al., 2008).

**Activinas.** Péptidos sintetizados por las células de la granulosa, de los que se

conocen tres formas. Las activinas están formadas por dos cadenas idénticas a la unidad de las inhibinas, cuya actividad es inversa a las activinas.

**BMP-15 (bone morphogenetic protein 15).** Proteína que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento del TGF. Expresada por los oocitos de los folículos primordiales, actúa sobre las células de la granulosa promoviendo su actividad mitótica. Su expresión se mantiene en el oocito hasta el momento de la ovulación.

Asimismo, se han reportado otros factores sintetizados por el propio oocito, que actuarían como potentes reguladores de la proliferación y la diferenciación de las células de la granulosa. Entre ellos:

**GDF-9 (growth differentiation factor 9).** Factor de crecimiento que pertenece a superfamilia del TGF. Es de naturaleza proteica y es secretada por el propio oocito, y actúa sobre las células de la granulosa alterando su expresión génica, estimulando su actividad mitótica, su proliferación y diferenciación. Determina el número de folículos destinados a desarrollarse y participa en la formación de gap junctions de Cx43, que permiten la comunicación citoplasmática directa entre las células de la granulosa adyacentes. Parece que desempeña un papel clave en la evolución del folículo primario a secundario, dado que en el ratón knockout para GDF-9 el desarrollo folicular se paraliza antes de alcanzar el estadio de folículos preantrales. Otros autores han descrito que el gradiente de GDF-9, sintetizado desde el oocito, sería responsable de la estratificación de las células de la granulosa en el cúmulo de los folículos preantrales, promoviendo, a su vez, la formación y la integridad del complejo cúmulo-oocito induciendo -hyaluronan sintasa 2, pentraxin 3, TNF- $\alpha$  e inhibiendo el activador de plasminógeno urokinasa.

**BMP-6 (bone morphogenetic proteins 6).** Secretado por el oocito, su papel es importante pero no imprescindible según demuestra el análisis del knockout de este factor.

Otros elementos implicados en la

formación de los folículos secundarios son los procesos mediados por la interacción kit-kit ligand (Driancourt et al., 2000; Hutt et al., 2006; Thomas and Vanderhyden, 2006) así como Kit ligand a través de la interacción con GDF9 y BMP15.

El receptor de c-kit se expresa en la superficie de los oocitos mientras que kit ligand se expresa en la membrana de las células de la granulosa. En este estadio también desempeñan un papel relevante otros factores secretados por las células de la teca como KGF (keratinocyte growth factor), EGF (Epidermal growth factor) y BMP-7 (bone morphogenetic proteins 7).

Es importante recordar que en la transición de folículos preantrales a antrales es cuando el oocito adquiere la capacidad de reanudar el proceso de meiosis, hasta ese momento detenido en profase de la primera división meiótica, e incorporar, a su vez, modificaciones epigenéticas esenciales.

Tanto en el caso de folículos preantrales, como en el de folículos antrales, las células de la granulosa expresan ya receptores para la hormona hipofisaria FSH, siendo a partir del estadio de folículo antral cuando las células de la granulosa expresan en su membrana receptores para la LH. La expresión de estos receptores hace posible el efecto de la hormona LH sobre estas células, induciendo cambios esenciales en la expresión génica preovulatoria e indirectamente promoviendo la finalización de la primera división meiótica y la ovulación de un oocito maduro que ha iniciado ya la segunda división meiótica.

En definitiva, el desarrollo hasta folículos preantrales depende exclusivamente de la acción de factores intra-foliculares de crecimiento y diferenciación y, a partir de esta etapa, el desarrollo folicular pasa a ser dependiente de las gonadotropinas hipofisarias. A medida que el desarrollo folicular avanza, la acción de la hormona FSH vía receptores de membrana va adquiriendo una importancia creciente, siendo responsable de la proliferación de las células de la granulosa y de la producción de la hormona esteroidea estradiol. Actuaría pues como potente

factor de crecimiento y diferenciación para los folículos pre-antrales y como factor de supervivencia para los folículos antrales.

Sin embargo, pese a la influencia prioritaria de las gonadotropinas en estas etapas del desarrollo, durante el estadio preantral también se han descrito factores intra-ovario de especial relevancia. Es el caso de las activinas, que actuarían como factor de crecimiento en el estadio de folículo preantral estimulando la liberación de FSH así como su acción en el ovario.

Durante la fase lútea temprana de un ciclo ovárico existen folículos preantrales procedentes de ciclos previos que se convierten en folículos antrales. En un ciclo posterior, aquellos folículos no degenerados alcanzan la fase de selección y optan al reclutamiento folicular; una cohorte de folículos avanza en su desarrollo, aunque sólo uno de ellos será finalmente seleccionado para alcanzar la madurez.

Los mecanismos responsables de la selección del folículo dominante vienen determinados por el número de receptores de FSH, la concentración de hormonas esteroideas y la presencia de factores de crecimiento específicos.

Durante las etapas más avanzadas del desarrollo folicular, el número de receptores de la LH se ve muy incrementado en las células de la teca y aparece de novo en las células de la granulosa. Las inhibinas, a su vez, potencian el efecto de la hormona LH sobre las células de la teca y promueven además la síntesis de andrógenos.

En la última etapa del desarrollo folicular, el folículo dominante llega a alcanzar un tamaño de 20 mm, siendo creciente su producción de estradiol. Más aún, se produce la diferenciación final de las células de la teca y la expansión del cúmulo por acción de los factores GDF-9 y BMP-15, producidos por el oocito.

Por último, se produce la ovulación, después de la culminación de la primera división meiótica, en la que desempeña un papel relevante el factor BMP-15 que promueve la separación de los cromosomas homólogos con la extrusión del primer corpúsculo polar, y del inicio de la segunda división meiótica. El folículo residual dará lugar al cuerpo lúteo con la participación de la LH.

## CONCLUSIONES

La foliculogénesis es un proceso de una extraordinaria complejidad, que está sujeto a una estricta regulación en la que están implicados factores extra-ovario e intra-ovario, siendo su contribución relativa, variable y dependiente del estadio del desarrollo folicular. A su vez, las rutas reguladoras de estos factores concurren y se imbrican en los procesos directamente relacionados con los mecanismos de comunicación e interacción celular.

**Tabla I**

**Factores solubles sintetizados por oocitos**

**GDF-9** (*growth differentiation factor 9*)

**BMP-15** (*bone morphogenetic protein 15*)

**BMP-6** (*bone morphogenetic protein 6*)

**Tabla II**

**Factores solubles sintetizados por las células de la granulosa**

**AMH** (*anti Müllerian hormone*)

**Activinas**

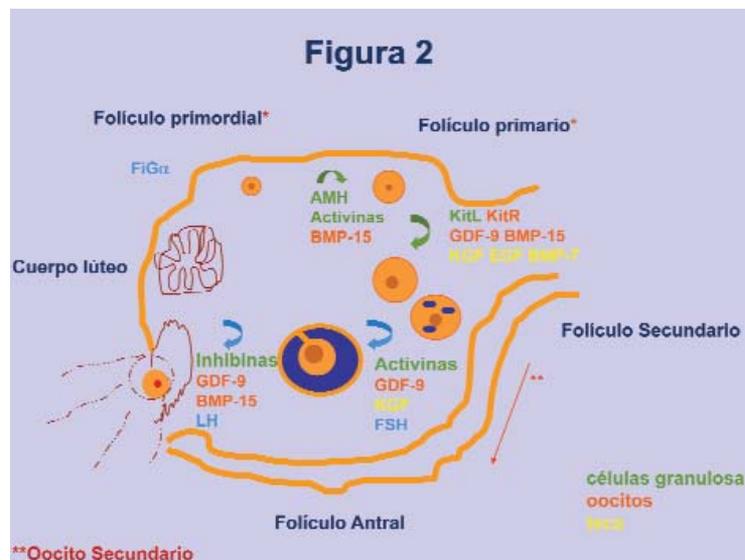
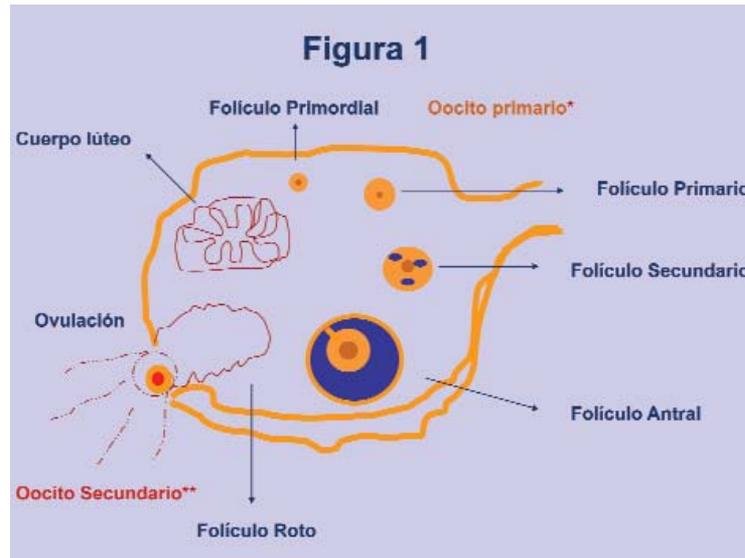
**Tabla III**

**Factores solubles sintetizados por la Teca**

**KGF** (*Keratinocyte growth factor*)

**EGF** (*Epidermal growth factor*)

**BMP-7** (*bone morphogenetic protein 7*)



## REFERENCIAS

- Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab* 2008 ; 19 :340-347.

- Dean J. Oocyte-specific genes regulate follicle formation, fertility and early mouse development. *J Reprod Immunol* 2002 ; 53: 171-180.

- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrintd R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reproduction* 2000; 5:143-152.

- Fortune JE, Cushman RA, Kito WS. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 53-60.

- Gershon E, Plaks V, Dekel N. Gap junctions in the ovary: expression, localization, and function. *Mol Cell Endocrinol* 2008 ; 282:18-25.

- Hutt KJ, Mc Laughlin EA, Holland MK. Kit/Kit ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol Reprod* 2006; 75:421-433.

- Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci* 2008 ; 1127:1-9.

- Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2007 ; 15:326-337.

- Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000 ; 127:4645-4654.

- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 12:19.



COMPROMETIDOS CON  
LA INNOVACIÓN EN DGP

pgdteam@reprogeneticsspain.com  
T+34 93 241 77 24

## NUEVOS TESTS DE DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS ESPECÍFICOS PARA EDAD MATERNA AVANZADA (AMA) Y ABORTOS DE REPETICIÓN (RAB)

### REALIZAMOS

Test de aneuploidías  
Reorganizaciones cromosómicas  
y enfermedades monogénicas

### OFRECEMOS

Programación inmediata  
Alta experiencia  
Continúa innovación tecnológica

### EXPERIENCIA

> 16.500 ciclos  
(Enero 2009)

### DIRECTORES CIENTÍFICOS

USA Santiago Munné - Jacques Cohen  
SPAIN Mireia Sandalinas - Carles Giménez  
UK Dagan Wells

## JUNIO

XXX Congreso SEGOBARCELONA

Del 15 al 19 de Junio

[sego@viajeseci.es](mailto:sego@viajeseci.es)

Curso Teórico Práctico de vitrificación con CRYOTOP

Organizado por el IVI Madrid Aravaca

FECHA: 15 al 16 de junio de 2009.

INSCRIPCIÓN: [www.ivi.es/ividocencia](http://www.ivi.es/ividocencia)

XXV Congreso Nacional de Genética Humana

Santiago de Compostela · 17, 18, y 19 de junio de 2009.

Secretaría Técnica: 981 569 040

Más información: <http://www.atlanticocongresos.com/genetica2009/programa.html>

---

## JULIO

7th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research (ISSCR)

Julio, del 8 al 11. Barcelona

<http://www.isscr.org/meetings/index.cfm>

---

## AGOSTO

The 7th Conference of Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (PRSFS)

August 21-23

Taipei, Taiwam

---

## SEPTIEMBRE

I Workshop de biopsia y fijación de corpúsculo polar

Organizado por Centro de medicina Embrionaria

Período de realización:

Grupo I: 22 de Septiembre

Grupo II: 23 de Septiembre

Inscripciones: Enviando la solicitud a [pgd@pgdcem.com](mailto:pgd@pgdcem.com) o directamente en la Web [www.pgdcem.com](http://www.pgdcem.com)

7th European Congress of Reproductive Immunology

September 17-20 · Marathon, Greece

---

## OCTUBRE

American Society for Reproductive Medicine 65th Annual Meeting

October 17-21 · Atlanta, Georgia. USA

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

---

## NOVIEMBRE

36 Symposium Internacional. Fertilidad 2009

Noviembre 2-4 · USP Institut Universitari Dexeus. Barcelona

<http://www.dexeus.com>

V Congreso Nacional ASEBIR

Noviembre 25-27 · Valencia

<http://www.asebir.com/Vcongreso/>

---

## DICIEMBRE

Máster en Anticoncepción y Salud Sexual y Reproductiva

PLAZO DE PREINSCRIPCIÓN: 15 de Noviembre de 2008 al 15 de Diciembre de 2008 · LUGAR: Fundación Española de Contracepción

Página Web: [www.fundaciondecontracepcion.es](http://www.fundaciondecontracepcion.es)

Correo electrónico: [fec@fundaciondecontracepcion.es](mailto:fec@fundaciondecontracepcion.es)

## NUEVA PÁGINA WEB

Tenemos el placer de informaros, a los que no lo hayáis constatado ya, que se encuentra activa la nueva página WEB de Asebir con un diseño totalmente remozado. Os recomendamos que entréis a "pasear" por ella y perdáis un poco de tiempo en actualizar vuestros datos. (<http://www.asebir.com/>).

## ASESORÍA JURÍDICA

Recordamos a todos las socias y socios que ASEBIR sufraga los costes de una asesoría jurídica especializada en temas de Reproducción Asistida y a quienes debéis dirigir todas las consultas de ámbito jurídico que os surjan en el desarrollo de nuestra actividad (<http://www.asebir.com/comunidad.htm>). Aunque en los últimos meses ha habido un incremento en el número de consultas, pensamos que aún no usamos suficientemente este importante recurso.

## NUEVA MODALIDAD DE SEGURO AMA DE RESPONSABILIDAD CIVIL

En conforme a la Ley de Ordenación de Profesiones Sanitarias 44/2003 del 21 de Noviembre del 2003 y la Ley de Sociedades Profesionales del 15 de Marzo 2007, AMA cuenta un seguro específico de Responsabilidad Civil Profesional para Sociedades Sanitarias que cubriría cualquier reclamación a la Sociedad y los empleados de la misma en el ejercicio de su actividad. Este seguro esta pensado para cubrir todas las necesidades y requisitos legales propios de cada actividad, en este caso, Reproducción Asistida. Para más información o personalización de presupuestos consulten la pagina web de AMA o pónganse en contacto con la Oficina de AMA más próxima.

## EL GRUPO ASEBIR DE INTERÉS EN DGP ORGANIZA SU PRIMER CURSO HANDS-ON EN BIOPSIA

El evento se celebrará en Valencia el día 25 de Noviembre por la mañana, en el mismo hotel del Congreso ASEBIR, y constará de una exposición técnica a cargo el Dr. Josep Santaló y de 4 horas de prácticas (fijación y biopsia) organizadas en dos grupos de máximo 8

participantes cada uno. Al finalizar habrá una comida conjunta. Más información en la web de ASEBIR.

## JORNADA SEF-ASEBIR SOBRE CONTROVERSIAS EN DGP

El pasado 8 de Mayo se celebró, en Málaga, la Jornada SEF-ASEBIR sobre controversias en DGP que ambas sociedades científicas organizaron con la colaboración de ANGELINI. Las ponencias se grabaron y está previsto que los patrocinadores las distribuyan durante los próximos meses.

## COMISIÓN NACIONAL DE REPRODUCCIÓN HUMANA ASISTIDA

En la 27ª Sesión plenaria de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida celebrada el 21 de Abril en la sede del Ministerio de Sanidad y Política Social se aprobó, por primera vez en España, la posible selección genética de embriones en dos casos concretos y excepcionales de cáncer hereditario (<http://www.msc.es/gabinetePrensa/notaPrensa/desarrolloNotaPrensa.jsp?id=1463>).

## CONVOCATORIAS ASEBIR 2009

### RENOVACIÓN CARGOS DE LA JUNTA DIRECTIVA

Cumplido el plazo de los cargos de la Junta Directiva, se convoca a todos los socios interesados en pertenecer al órgano directivo a que propongan su candidatura para las próximas elecciones, según los estatutos de ASEBIR Capítulo III, Apartado 1º, artículo 16.

Los asociados interesados en presentar su candidatura a la Junta Directiva ASEBIR deberán enviar a la secretaría de la asociación, a la atención de la Secretaria de la Junta, la siguiente documentación:

- Carta de presentación de candidatura.
- Candidatura.
  - Lista cerrada de 12 miembros.
  - Debe cubrir todos los cargos de la Junta Directiva, especificando qué cargo ocupará cada uno de los miembros.
- Programa de actuación.
- Avalués.

- Mínimo 30 socios con nombre completo, DNI y firma original de cada avalista.

El plazo de presentación de las diferentes candidaturas quedará abierto a partir del 26 de septiembre de 2009 y se prolongará hasta el día 26 de octubre de 2009 a las 17:00 hrs.

Las votaciones se realizarán el día 26 de noviembre, dentro del marco del V Congreso ASEBIR de Valencia. Si algún socio tiene pensado no acudir al Congreso este día, deberá realizar su voto por correo o utilizar la modalidad de voto delegado. Todos los formularios necesarios para realizar el voto se encuentran en la Web del Congreso en formato PDF.

Se informará de los resultados de las votaciones y se presentará a la nueva Junta Directiva durante la Asamblea General Ordinaria del día 27 de noviembre de 2009.

## SEDE DEL VI CONGRESO ASEBIR 2011

También queda abierto el plazo de presentación de candidaturas para la organización del próximo congreso ASEBIR en el año 2011, las candidaturas se podrán presentar hasta el día 1 de Septiembre de 2009.

Los interesados deberán mandar a la secretaría de ASEBIR, a la atención de la Vocalía de Congresos, la siguiente documentación:

- Datos de la persona responsable de la solicitud, incluido centro de trabajo y comité organizador local.
- Memoria con la trayectoria de la actividad en Biología de la Reproducción del comité organizador solicitante.
- Ciudad que representa la candidatura, especificando comunicaciones y disponibilidad de alojamiento.
- Sede del Congreso (especificar ubicación, espacios disponibles, etc.).

La nueva sede será presentada en la Asamblea General Ordinaria del día 27 de noviembre de 2009 dentro del marco del V Congreso ASEBIR de Valencia

Si precisáis más información podéis poneros en contacto con nuestra secretaría o consultar en la Web del Congreso.

## 1ª JORNADA DE FORMACIÓN ASEBIR SOBRE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

ASEBIR, en un esfuerzo por cumplir el mandato estatutario de fomentar la formación continuada entre sus miembros, presenta la 1ª Jornada de Formación ASEBIR sobre Reproducción Asistida, especialmente orientada a los embriólogos jóvenes.

Esta iniciativa nace con la voluntad de llegar a ser una actividad principal en nuestra sociedad, con carácter bienal alterna al congreso y dos objetivos concretos: que los participantes aprendan en base a los manuales que ASEBIR publica y que se conozcan y debatan entre ellos.

Para esta 1ª Jornada de Formación ASEBIR las sedes y fechas fueron las siguientes:

Barcelona – 6 de Marzo de 2009  
Can Cortada

Madrid – 17 de Abril de 2009  
La Quinta del Marques de la Concordia

Sevilla – 15 de Mayo de 2009  
Hotel Cortijo El Esparragal

## JORNADAS ACREDITADAS

Para estas Jornadas se solicitó la acreditación a la Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias de la Comunidad de Madrid y fue concedido 1 crédito, lo que refleja el alto nivel del programa científico ya que para un Curso de una sola Jornada lo normal viene siendo entre 0,50 y 0,75 créditos.

## PONENTES Y MODERADORES

Como ponentes contamos con la inestimable participación de:

Dr. Miguel Ruiz (CREA, Valencia), con la exposición "Actualización en el Laboratorio de Andrología".

Dr. Fernando Abellán (Derecho Sanitario Asesores, Madrid), con la exposición "Aspectos Jurídicos de TRAs, exposición de casos prácticos".

Dr. José Antonio Castilla (H. U. Virgen de las Nieves, Granada), con la exposición "Calidad Embrionaria. Catalogación ASEBIR, casos prácticos y test de control de calidad".

Y como moderadores actuaron miembros de la Junta directiva de ASEBIR:

En Barcelona moderaron la jornada el Presidente de ASEBIR, Dr. Mark Gossman i Camps (Centro Médico Tecknon) y la Dra. Montserrat Boada (Institut Universitari Dexeus)

En Madrid moderaron el Dr. Jorge M. Cuadros (Clínica FIV) y el Sr. Manuel Ardoy (H. U. Gregorio Marañón), y En Sevilla fue moderadora de la Jornada la Vicepresidenta de ASEBIR, Dra. M. Victoria Hurtado de Mendoza (CEHISPRÁ).

## PATROCINIOS

Las Jornadas también contaron con el patrocinio de Angelini y Cook, sin cuya colaboración no hubiera sido posible hacer este despliegue.

## ASISTENTES

El número de asistentes por Jornada se había limitado a 25 personas, pero finalmente la distribución fue la siguiente: Barcelona – 26 alumnos; Madrid – 23 alumnos, y Sevilla – 25 alumnos.





La mayoría socios de ASEBIR, pero contamos con un total de 17 asistentes que no son asociados, pero que mostraron su interés en formar parte de nuestra asociación si estos Cursos se repiten de forma periódica.

## VALORACIÓN DE LAS JORNADAS POR LOS ASISTENTES

Con el fin de evaluar las Jornadas, se paso a los asistentes un breve cuestionario en el que se les pedía que señalaran con una cruz en la escala de 0 a 5 su grado de satisfacción en cada uno de los siguientes aspectos.

En las encuestas las puntuaciones dadas por los asistentes se han concentrado, en su gran mayoría, entre los valores 3 y 5, siendo el nivel del profesorado lo más valorado por los asistentes.

También se les pidió que indicaran sus comentarios o sugerencias siendo lo más destacable: El deseo de que se hagan más cursos, pero con una duración de dos días, para profundizar en algunos temas; repetir las jornadas y dividir las en Andrología y Embriología; o dedicar más tiempo de discusión y preguntas.

Las comparativas de las encuestas son las siguientes:

## VALORACIÓN DE LAS JORNADAS POR MARK GROSSMANN

La Dra. M. Victoria Hurtado de Mendoza y yo mismo, como responsables de ASEBIR y avaladores de esta iniciativa formativa, estamos muy satisfechos de los resultados y agradecemos enormemente y públicamente el esfuerzo de los tres ponentes ya que ellos son el Alma Mater de esta Jornada: ellos han conseguido, con unas comunicaciones ambiciosas y actuales, captar el interés de los asistentes durante todo el día y hacer útil esta empresa.

Para esta actividad pedimos a la secretaría de ASEBIR que seleccionara espacios singulares y acogedores para facilitar la interacción entre los asistentes. Como siempre nuestra secretaría estuvo a la altura: coordinó perfectamente la logística y acertó en las sedes.

Agradecer, finalmente, el apoyo económico de Cook y Angelini, más especialmente en este año que también organizamos el Congreso ASEBIR. Sin su participación no hubiésemos podido poner en marcha este proyecto formativo. Para las próximas ediciones, proponemos alternar Congreso los años impares con Jornada en los años pares y así dar aire a la carga formativa y económica.

Como decía al principio, estamos muy satisfechos ya que, además de la calidad de la Jornada, conseguir que en su primera edición se llegue a 74 alumnos "júnior" es ¡todo un éxito! que da alas a nuestras sociedad.

	BARCELONA 26 pax.	MADRID 23 pax.	SEVILLA 25 pax.
<b>Cuestionario - Jornada ASEBIR</b>	<b>MEDIA</b>	<b>MEDIA</b>	<b>MEDIA</b>
1 ¿Ha cumplido el curso sus expectativas?	4,35	4,61	4,04
2 Calidad global del curso	4,35	4,61	4,16
3 Temas tratados	4,15	4,35	3,84
4 Método del trabajo empleado	4,35	4,65	3,83
5 Capacidad pedagógica del profesorado	4,81	4,70	4,28
6 Nivel de competencia del profesorado	4,85	4,74	4,16
7 Grado de profundización de los temas tratados	3,65	4,00	3,88
8 Forma de coordinación del profesorado al grupo	4,31	4,35	4,04
9 Grado de participación	3,85	3,61	3,48
10 Duración y Ritmo	4,00	4,00	3,84
11 Organización	4,38	4,43	4,00
12 Material y documentación entregada	3,69	4,00	3,68
13 Local, su instalación y ambientación	3,96	4,35	4,28

## 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 Embryology; 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

# V Congreso

Valencia '09



25, 26 Y 27 DE NOVIEMBRE

Palacio de Congresos



ASEBIR