Junio 2011 Vol. 16 · Nº1

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

REVISTA ASEBIR

ASEBIR

VI CONGRESO GIRONA 2011

ACTUALIDAD

Implementación de los nuevos criterios de la OMS en la práctica clínica

Diagnóstico Genético Preimplantacional de aneuploidías: indicaciones, técnicas y estrategias

AULA JOVEN

Impacto de las anomalías del espacio perivitelino de los ovocitos en el desarrollo embrionario y la tasa de implantación

¿Es útil el estudio de la fragmentación del ADN espermático para la indicación de IAC como TRA?

ARTÍCULOS

Implicación de la técnica MSOME en ciclos de ovodonación

Influencia del ejercicio físico y el índice de masa corporal sobre la calidad espermática: análisis en pacientes de reproducción asistida

FORMACIÓN CONTINUADA

Células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas: ¿pasado, presente y/o futuro en la medicina regenerativa?

AGENDA / NOTICIAS / DEBATE / NORMAS DE PUBLICACIÓN

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Parámetros sometidos a examen:	*Catalogación de embriones D+1, D+2 y D+3.*
	Comprobación de toxicidad de material.
Características específicas:	*Duración: 1 año.*
	Nº Especímenes: vídeo y material esterilizado.
Envío de muestra:	*Uno.*
Envío documentación:	*Uno.*
Envío de datos:	*Vía página web.*
Informes:	*Valoración por consenso de laboratorios*
	Valoración por consenso de grupo de expertos
Proceso de datos:	*Informatizado.*

PLAZO MÁXIMO DE INSCRIPCIÓN
31 DE JULIO DE 2011

Con la colaboración de:

Ceifer

ASEBIR

SUMARIO

SUMARIO Pág.

EDITORIAL 3
Certificado ASEBIR en: Reproducción Asistida Humana. Embriología Clínica
Carmen Ochoa Marieta

ACTUALIDAD 4
Implementación de los nuevos criterios de la OMS en la práctica clínica
Cristina González Ravina, Alberto Pacheco Castro

Diagnóstico Genético Preimplantacional de aneuploidías: indicaciones, técnicas y estrategias
Mariona Rius Mas, Laura Marquès Soler, Joaquima Navarro Ferreté

ARTÍCULOS 19
Implicación de la técnica MSOME en ciclos de ovodonación
Cristina Urda, Ana R. Díaz, Mª Carmen Cañadas, Vicente Badajoz, Silvia Camacho, Moisés de la Casa, Julio Gijón, Jose A. Gragera, Ricardo Bonache, Alberto Martínez de Arenaza

Influencia del ejercicio físico y el índice de masa corporal sobre la calidad espermática: análisis en pacientes de reproducción asistida
Marta Campos Guarnizo, Elena Delgado Niebla, Sara Morgado García, Beatriz Sánchez-Correa, Mª Rosario Gonzáles Roncero, Juan Gordillo Gonzálvez de Miranda, José De Julián y Fernández de Velasco, Raquel Tarazona Lafarga, Javier García Casado

AULA JOVEN 34
Impacto de las anomalías del espacio perivitelino de los ovocitos en el desarrollo embrionario y la tasa de implantación
Marta Herrero, Pere Feliu, Celia Vives, Gerard Albaigès, Mònica Ballesteros, Teresa Planella, Francesca Vidal, Imma Saumell

¿Es útil el estudio de la fragmentación del ADN espermático para la indicación de IAC como TRA?
María José Lázaro, Laura Vidal, Concepción Linares, Luz Rodríguez

DEBATE 44
DPI en enfermedades de aparición tardía

VI CONGRESO NACIONAL DE ASEBIR 50
Programa Científico Preliminar

FORMACIÓN CONTINUADA 55
Células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas: ¿pasado, presente y/o futuro en la medicina regenerativa?
José Luis Cortés, José Luis García Pérez

AGENDA 62
NOTICIAS 63
INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES - NORMAS DE PUBLICACIÓN 64

Junio 2011 Vol. 16 Nº1

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

EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS
Dra. Marga Esbert Algam
IVI BARCELONA, Barcelona

Dr. Jorge Cuadros Fernández
CLÍNICA FIVMADRID, Madrid

COMITÉ EDITORIAL
Presidente:
Dr. Manuel Ardoy Vilches
HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

Vicepresidenta y RRPP:
Dra. Carmen Ochoa Marieta
CER. CLINICA COTERO - Santander

Secretaría y RRPP:
Dra. Montserrat Boada Palá
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

Tesorería y Relaciones con la Industria:
Dr. Fernando Marina Rugero
INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

Vocalía de Grupos de Interés e Investigación:
Dr. Josep Santaló Pedro
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

Vocalía de congresos:
Dra. María José Torelló Ybañez
HOSPITAL QUIRÓN BARCELONA - Barcelona

Dra. Yolanda Mínguez Royo
IVI MADRID - Madrid

Vocalía de Docencia y formación continuada:
Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel
INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA –IERA -Badajoz

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

Dr. Juan Manuel Moreno García
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

Vocalía Página Web::
Dr. Juan Manuel Moreno García
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

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

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

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

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

Vit Kit® - Freeze and Vit Kit® - Thaw

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

Werfen Group | IZASA

Para más información : irvine@izasa.es o visite nuestra web www.izasa.es

Only from Irvine Scientific

IrvineScientific
Grow With Us™

Data on file*

©2009 Irvine Scientific P/N 10301R Rev.0

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

CERTIFICADO ASEBIR EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA HUMANA. EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

Como todos sabéis, la primera convocatoria sobre la certificación ASEBIR en Reproducción Asistida Humana: Embriología Clínica, ha finalizado el 31 de Marzo del presente año. Quiero comentaros que ha sido un éxito; 137 compañeros la han solicitado a través de la vía de convalidación.

Los listados con los nombres de cada uno, se encuentran publicados en el área restringida a los socios de nuestra página Web, con la intención de mantener la privacidad.

A partir de este momento, elevaremos a escritura pública ante notario el citado listado y a continuación se realizarán los diplomas, con el número de registro individual de cada uno de vosotros. Y se os entregarán, personalmente, en el próximo congreso de ASEBIR, a todos aquellos que podáis asistir. Al resto se os enviará a vuestra dirección postal.

Desde ASEBIR se continúa trabajando en aras a conseguir el reconocimiento de nuestra especialidad, y entendemos que la certificación significa un paso transitorio y necesario, que surgió a instancias del Ministerio de Sanidad, Consumo, Política Social e Igualdad (MSCPSeI), para seguir avanzando en nuestro proyecto.

El reconocimiento de la existencia de una necesidad social y profesional existe, y ha sido aceptado en los diferentes apoyos que hemos recibido por parte de los colegios profesionales y organizaciones generales de colegios profesionales, así como de diversas sociedades científicas.

ASEBIR, a través de la comisión de especialidad y de sus delegados autonómicos, está gestionando estos apoyos e intentando que exista un reconocimiento oficial, vía sanidad, vía educación en las diferentes comunidades autónomas, y por supuesto en el Ministerio.

Sabemos que es una tarea ardua y larga, y que posiblemente algunos de nosotros no la disfrutemos, pero estamos convencidos de que es estrictamente necesaria.

La sociedad y los pacientes necesitan profesionales regularmente formados y controlados administrativamente, y somos nosotros, los propios profesionales, los que lo estamos demandando.

Es por esto que os animo a que participéis en las siguientes vías de obtención de dicho Certificado, la vía rápida y la vía mediante examen. Ambas convocatorias ya están abiertas; inscribiros en ellas y utilizar el listado de los embriólogos que han obtenido la certificación, para pedirles los avales de los que hablan las normas.

Es un esfuerzo que debemos hacer cada uno de nosotros; solo así conseguiremos las razones suficientes para seguir luchando por el reconocimiento de nuestra especialidad.

Carmen Ochoa Marieta
Vicepresidenta de ASEBIR

IMPLEMENTACIÓN DE LOS NUEVOS CRITERIOS DE LA OMS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Cristina González Ravina[1,3], Alberto Pacheco Castro[2,3]
[1]Laboratorio de Andrología y Banco de Semen. Clínica IVI Sevilla, [2]Laboratorio de Andrología y Banco de Semen. Clínica IVI Madrid, [3]Grupo de Interés de Andrología ASEBIR

Como es bien sabido, el primer Manual de Laboratorio para el análisis de semen humano y su interacción con el moco cervical se publicó en 1980, en respuesta a la elevada necesidad de estandarizar los protocolos para dicho análisis (WHO Laboratory Manual, 1999a). Dicho manual ha sido sometido a 3 revisiones posteriores, y el año pasado, la OMS elaboró la 5ª edición del "Manual para el examen y procesamiento del semen humano". En esta última versión, entre otros aspectos, se han revisado los valores de referencia, el algoritmo para los diagnósticos y la interpretación clínica de estos diagnósticos. Hasta el año pasado, en todos los laboratorios de Andrología, así como los de reproducción asistida, se trabajaba conforme a las directrices recomendadas en los tres manuales de 1999 (WHO, 1999a, b y c).

Haciendo un breve repaso de los mismos, así como de los valores de referencia existentes hasta el 2010, observamos que si bien cuando se establecieron en 1999 podrían haberse considerado como útiles, con el paso de los años se fue haciendo evidente una necesaria actualización de los mismos. No debemos olvidar que los trabajos realizados para establecer los valores de referencia en 1999 se basaron en el análisis de dos muestras de semen de un número no muy elevado de varones, en diferentes laboratorios en los que no se había estandarizado los métodos de trabajo ni implantado los sistemas de calidad correspondientes.

En el manual publicado en 1999, los espermatozoides se clasificaban en 4 categorías en función de la movilidad: tipo a (móviles progresivos rápidos), tipo b (móviles progresivos lentos), tipo c (móviles no progresivos) y tipo d (inmóviles). Una de las principales limitaciones de aquella clasificación es que se reconoció que el estudio de la movilidad progresiva espermática (espermatozoides tipo a y b), así como el de la morfología, aparte de ser subjetivos no estaban sujetos a ningún protocolo bien estandarizado entre los laboratorios (Cooper et al., 1992; Dunphy et al., 1989; Neuwinger et al., 1990). Sin embargo, los valores obtenidos para la concentración espermática y la movilidad total (a+b+c) sí se consideraron aceptables, puesto que podían medirse de manera reproducible en la mayoría de los centros. Por esto, se recomendó que cada laboratorio estableciese sus valores límite de normalidad para dichas variables, y que además incluyese los adecuados controles de calidad tanto interno como externo, que han quedado ampliamente desarrollados en el nuevo manual de 2010.

A pesar de todo, comparando las características espermáticas de una serie de varones y utilizando análisis estadístico, se definieron rangos de referencia para los principales parámetros seminales atendiendo a su capacidad para discriminar entre las dos poblaciones estudiadas (fértil vs sub-fértil o sub-fértil vs infértil) (Comhaire et al., 1987; Ombelet et al., 1997a).

Con respecto a la morfología, el manual refiere la puesta en marcha de un estudio multicéntrico para el análisis de este parámetro seminal. En esta edición de 1999 se especifica que los datos obtenidos en centros con programas de reproducción asistida sugieren que valores de morfología por debajo del 15% están relacionados con una disminución de la tasa de fecundación en FIV (Ombelet et al., 1997b).

En cuanto a la nomenclatura, los términos utilizados para expresar valores del seminograma por debajo de los valores de referencia son:

ASTENOZOOSPERMIA: móviles progresivos < 50% a+b ó <25% a

OLIGOZOOSPERMIA: concentración < 20 millones/ml

TERATOZOOSPERMIA: morfología < 15% formas normales

NECROZOOSPERMIA: vitalidad < 75 %

CRIPTOZOOSPERMIA: ausencia de espermatozoides en la muestra de eyaculado en su análisis inicial, y presencia de espermatozoides tras la centrifugación.

En la tabla se muestran los valores de referencia establecidos en 1999:

Parámetro seminal	Valor inferior de referencia
Volumen	2.0 mililitros
pH	7.2
Concentración	20 millones de espermatozoides por mililitro
Número total de espermatozoides	40 millones de espermatozoides por eyaculado
Movilidad	50% a+b de los espermatozoides del eyaculado 25% a de los espermatozoides del eyaculado
Vitalidad	75% vivos de los espermatozoides del eyaculado
Morfología	15% formas normales

AZOOSPERMIA: ausencia de espermatozoides en la muestra de eyaculado en su análisis inicial y ausencia de espermatozoides tras la centrifugación. Concentración = 0.

ASPERMIA: ausencia de eyaculado. Volumen = 0.

En base a la clasificación seminal del varón, su historia clínica y su exploración física (así como cualquier otra información adicional) se podría dar el diagnóstico del varón atendiendo a un diagrama que recoge diferentes situaciones en cuanto a la concentración espermática, desde muestras con azoospermia, criptozoospermia u oligozoospermia (WHO, 1999). Cabe destacar que en el manual de 1999 se utiliza una subclasificación de las distintas alteraciones seminales (oligo-, asteno-, terato-, necrozoospermia) en grados que van de leve a grave pasando por moderado.

NOVEDADES DEL MANUAL OMS 2010

Tras 11 años desde la edición de 1999, se hizo cada vez más necesaria una revisión y actualización de los valores de referencia y los protocolos de trabajo establecidos, de manera que la nueva edición online del Manual OMS de 2010 presenta un nivel de detalle mucho más elevado en cuanto al análisis seminal: soluciones de trabajo, procedimientos, cálculos e interpretación de los resultados. Además recomienda usar un método concreto en aquellos casos en que exista más de una posibilidad o técnica de análisis.

Dentro de este aspecto, los principales cambios reflejados en la 5ª edición incluyen:

a) un nuevo protocolo de trabajo a la hora de realizar el recuento de la concentración espermática. Se han modificado las diluciones de semen recomendadas y las áreas de la cámara de recuento necesarias para establecer el número de espermatozoides (concentración) con objeto de poder contar 200 espermatozoides por replicado. Se hace mayor hincapié en reducir los errores de muestreo, dando un mayor peso al volumen de la muestra (que antes no era tan relevante) que debe ser medido con precisión utilizando el método recomendado por la OMS

b) respecto al diagnóstico de azoospermia, se profundiza en el protocolo de trabajo a seguir con este tipo de muestras en las que no se encuentran espermatozoides en el eyaculado, diferenciando entre la necesidad de obtener un valor de concentración y/o movilidad preciso o centrifugar la muestra para aumentar la probabilidad de encontrar espermatozoides tras el lavado

c) se recogen cambios muy significativos en las categorías de movilidad espermática. Se recomienda a partir de ahora diferenciar los espermatozoides únicamente según 3 categorías: móviles progresivos (PM) (uniendo las anteriores categorías a y b), móviles no progresivos (NP) (la anterior categoría c) e inmóviles (IM) (como categoría previa d)

d) en esta edición se recoge con mayor detalle el análisis de la morfología, y se incluyen fotos de espermatozoides considerados normales y espermatozoides con una o varias anomalías morfológicas, así como explicaciones precisas para mejorar la formación de los técnicos en el estudio de dicho parámetro seminal

Por otra parte, cuenta con un capítulo sobre criopreservación de semen ampliado e incluido en el apartado de preparación de semen; así como un capítulo entero dedicado a los controles de calidad, que aparte de novedoso supone una recomendación de la OMS para tener garantía de calidad en nuestros laboratorios. Incluye tanto el control de calidad externo como el interno.

Con todo ello, la 5ª edición del Manual queda dividida en 3 partes:

- Análisis de semen (capítulos 2-4)
  - técnicas estándar
  - tests opcionales
  - tests de investigación

- Preparación de semen (capítulos 5 y 6)

- Control de calidad (capítulo 7)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y METODOLOGÍA EMPLEADA

Para el estudio se analizaron las muestras de semen de unos 4500 varones de 14 países y 4 continentes, divididos en 3 grandes grupos: varones fértiles, varones de fertilidad desconocida y varones normozoospérmicos según el manual de 1999. El grupo de varones cuya pareja había conseguido gestación en un plazo $\leq$ 12 meses se escogió como grupo control para establecer los valores de referencia de los parámetros seminales (1953 varones, 5 estudios en 8 países de 3 continentes).

Todos los laboratorios que participaron en el estudio obtuvieron los datos utilizando métodos estandarizados de análisis seminal (WHO, 1999a, b). Como en dicho manual se ofrecen diferentes métodos para la determinación del volumen, la concentración espermática y la tinción morfológica, el método empleado en cada laboratorio se ha tenido en cuenta a la hora de valorar los resultados. Además, en muchos laboratorios se implantaron con retraso controles de calidad externos e internos, por lo que los datos se han revisado para calcular la distribución de referencia teniendo en cuenta este hecho (Castilla et al., 2006).

Para el estudio se utilizó una única muestra de semen eyaculado por varón, que fue recogida con un periodo de abstinencia sexual de 2 a 7 días. La concentración se midió en la mayoría de los casos empleando el hemocitómetro de Neubauer mejorado, y, respecto a la movilidad, se recogieron datos sobre movilidad total (WHO 1999: a+b+c) y movilidad progresiva (WHO 1999: a+b) (Cooper and Yeung., 2006). Los datos de morfología se tuvieron en cuenta sólo de aquellos centros que utilizaron el criterio estricto de Tygerberg (WHO, 1999), y para la vitalidad (analizada por tinción eosina-nigrosina), el número de muestras estudiadas fue significativamente menor que para el resto de los parámetros seminales

(sólo aportaron datos 2 centros). La ventaja de tener estandarizados los protocolos de trabajo es que se ha minimizado el error analítico y los valores presentados se consideran representativos de las características seminales de un varón fértil.

NUEVOS VALORES DE REFERENCIA Y DIAGNÓSTICOS

En esta edición se revisan y establecen los nuevos valores de referencia con los que debemos trabajar actualmente, que se encuentran recogidos en el artículo (de acceso libre) publicado en Mayo de 2010 en la revista internacional Human Reproduction Update (Cooper et al., 2010). En la tabla II, obtenida de este artículo, se recogen los valores de referencia establecidos con un 95% CI.

En la tabla A1.1 se recogen con mayor claridad los límites inferiores de referencia del quinto percentil de los valores en una población de referencia de varones fértiles (Cooper et al., 2010).

Todo esto va a su vez acompañado de algunos cambios en cuanto al diagnóstico de las muestras, de modo que aunque se mantiene la nomenclatura, se han producido algunas modificaciones:

Table A1.1 Lower reference limits (5th centiles and their 95% confidence intervals) for semen characteristics

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10^6 per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR+NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
Other consensus threshold values	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10^6 per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

TERATOZOOSPERMIA: Formas normales por criterio estricto (Tygerberg) < 4 %

ASTENOZOOSPERMIA: Móviles progresivos < 32 % (no se tiene en cuenta el total de móviles (% PR+NP) aunque esté por debajo del valor de referencia).

OLIGOZOOSPERMIA: Número total de espermatozoides < 39 millones. La OMS prefiere este parámetro antes que la concentración de la muestra, que era el parámetro de elección en el manual de 1999.

NECROZOOSPERMIA: Vitalidad < 58 % y porcentaje de espermatozoides inmóviles muy elevado. Este segundo criterio es arbitrario ya que la OMS no indica un número concreto, pero sí que haya también muchos inmóviles. De esta manera se evitan falsas necrozoospermias que alarmen injustificadamente.

CRIPTOZOOSPERMIA/AZOOSPERMIA: No hay cambios respecto a 1999.

PROBLEMAS Y MEJORAS DE LA NUEVA CLASIFICACIÓN OMS

Como en todo cambio o revisión, nos hemos encontrado con mejoras importantes pero también con algunos inconvenientes que tendremos que ir solucionando a medida que nos vayamos familiarizando con las modificaciones. Algunas de ellas han sido:

Table II Distribution of values, lower reference limits and their 95% CI for semen parameters from fertile men whose partners had a time-to-pregnancy of 12 months or less

	N	Centiles										
		2.5	(95% CI)	5	(95% CI)	10	25	50	75	90	95	97.5
Semen volume (ml)	1941	1.2	(1.0–1.3)	1.5	(1.4–1.7)	2	2.7	3.7	4.8	6	6.8	7.6
Sperm concentration (10^6/ml)	1859	9	(8–11)	15	(12–16)	22	41	73	116	169	213	259
Total number (10^6/Ejaculate)	1859	23	(18–29)	39	(33–46)	69	142	255	422	647	802	928
Total motility (PR + NP, %)*	1781	34	(33–37)	40	(38–42)	45	53	61	69	75	78	81
Progressive motility (PR, %)*	1780	28	(25–29)	32	(31–34)	39	47	55	62	69	72	75
Normal forms (%)	1851	3	(2.0–3.0)	4	(3.0–4.0)	5.5	9	15	24.5	36	44	48
Vitality (%)	428	53	(48–56)	58	(55–63)	64	72	79	84	88	91	92

*PR, progressive motility (WHO, 1999 grades a + b); NP, non-progressive motility (WHO, 1999 grade c).
The values are from unweighted raw data. For a two-sided distribution the 2.5th and 97.5th centiles provide the reference limits; for a one-sided distribution the fifth centile provides the lower reference limit.

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

1. Cambio del concepto de oligozoospermia. La OMS de 1999 asignaba este diagnóstico a aquellas muestras con concentraciones por debajo del valor de referencia de dicho parámetro (20 millones/ml). Sin embargo, se ha hecho evidente que la propia concentración depende del volumen final de la muestra, por lo que en el Manual de 2010 se vincula preferentemente el diagnóstico de oligozoospermia al número total de espermatozoides, siempre que éste se encuentre por debajo de los 39 millones. Esto ha supuesto una mejora en la valoración de dicho parámetro.

2. Cambio en las categorías de movilidad espermática. Dado que la antigua categoría "a" del Manual de 1999 era difícil de justificar cuando el recuento de movilidad de una muestra se realizaba sin un sistema computerizado, y que realmente se observó que la información relevante de este parámetro se encontraba en el nº total de móviles progresivos (a+b), se han modificado las categorías de movilidad espermática que ahora recomiendan diferenciar los espermatozoides según 3 tipos: móviles progresivos (PM), móviles no progresivos (NP) e inmóviles (IM). Algunos centros consideran ventajosa la eliminación de dicha categoría.

3. Disminución del porcentaje de formas normales en la morfología. Es bien sabido que este parámetro es, no sólo el más subjetivo del análisis seminal sino el que mayor controversia ha suscitado a efectos de indicar uno u otro tipo de tratamiento en las clínicas de reproducción asistida. Se han publicado numerosos artículos en defensa o detrimento de la importancia de la morfología en muchos de los aspectos clave de estos tratamientos: tasa de gestación, tasa de implantación, éxito en la fecundación, etc. (Kruger et al., 1986; Kruger et al., 1988; Menkveld., 1990; Mortimer and Menkveld., 2001; Garrido et al., 2005). De cualquier modo, siempre ha sido objeto de debate, no sólo dentro del laboratorio de andrología y FIV, sino entre estos departamentos y los clínicos, pues, salvo casos extremos de morfologías con elevadas anomalías, se ha hecho difícil unificar los criterios de valoración morfológica de las muestras, incluso realizando los correspondientes controles de calidad tanto internos como externos.

4. La vitalidad espermática y la necrozoospermia. Parece que este parámetro, que además la OMS no incluye como "de obligatorio estudio" en el seminograma sino como algo muy recomendable, toma fuerza en esta nueva edición. Su vinculación con el porcentaje de espermatozoides inmóviles, sin que aparezca establecido un valor exacto a partir del cual diagnosticar una necrozoospermia, hace que sea fijado de manera individualizada por cada grupo de trabajo en función de la metodología empleada en el centro y la información que espera obtener con dicho diagnóstico. Es bien sabido que el estudio de la vitalidad resulta esencial en aquellos casos en que nos encontremos con un porcentaje de espermatozoides inmóviles por encima del 50%. No es lo mismo tener un porcentaje de espermatozoides inmóviles elevado pero que estén vivos tras test de tinción (que orientaría a posibles defectos estructurales de la cola; Chemes and Rawe, 2003), que un elevado porcentaje de inmóviles y además muertos (más relacionado con patología del epidídimo; Wilton et al, 1988; Correa-Pérez et al., 2004).

5. El hecho de que hayan desaparecido los "adjetivos" de leve, moderado y grave hace que los diagnósticos de las muestras con alteraciones queden incompletos y se obligue a tener en cuenta los valores numéricos de volumen, concentración, movilidad y morfología para poder hacernos una idea real del estado de la muestra. Ya que en función del número de millones de móviles progresivos determinaremos el tipo de tratamiento a realizar en una pareja, no será lo mismo un varón con alteraciones leves, que en algunos casos permitiría realizar técnicas de inseminación artificial, que otro varón con alteraciones graves que serían clara indicación de FIV o incluso ICSI.

6. Para finalizar, quizás el aspecto que más puede haber llamado la atención es la diferencia entre 1999 y 2010 de un varón con un seminograma con sus parámetros dentro de los valores de referencia en cada caso. Veamos las dos posibles situaciones.

Observamos que el cambio en cuanto al número de millones de móviles progresivos se ve reducido en un 64% (o un 40% si utilizamos el criterio de espermatozoides totales ahora recomendado), respecto al que se obtenía para un varón con una muestra de semen con los valores límite de referencia en 1999. El cambio en este aspecto podría

Parámetro seminal	Semen 1999	Semen 2010
Volumen	2.0 mililitros	1.5 mililitros
Concentración	$20x10^6$ espermatozoides/ mililitro	$15x10^6$ espermatozoides/ mililitro $39x10^6$ espermatozoides totales
Movilidad progresiva	50%	32%
Morfología	15% formas normales	4% formas normales
Millones móviles progresivos	20	7.2 12

resultar más problemático a nivel de consulta clínica, ya que varones ahora diagnosticados como normales en nuestros centros pueden recibir la recomendación de someterse a un ciclo de IAH o incluso de FIV. Evidentemente, cada centro deberá decidir si cambia sus criterios o bien si hace el esfuerzo de explicar a los pacientes que con los parámetros de referencia actualmente aceptados se asume la posibilidad de que, aun siendo normales, pueden indicar un determinado tratamiento de reproducción asistida.

DISCUSIÓN

Es importante en primer lugar recordar que el seminograma, por sí solo, no tiene capacidad diagnóstica (sensibilidad y especificidad) para indicar infertilidad masculina. Los diagnósticos del seminograma se entienden mejor como una simple descripción de la muestra para ver si se "asemejan" a los valores de una población fértil. Sí podrían tener utilidad diagnóstica clínica para detectar una criptozoospermia o azoospermia.

Por otra parte, no estaría de más reflejar que, para aquellos que nos dedicamos a la reproducción asistida, es conveniente diferenciar entre diagnóstico seminal de un varón y utilidad "real" de la muestra en un tratamiento de infertilidad. Sabemos que la OMS establece claramente que estar por debajo de los valores de referencia o tener una muestra no "normozoospérmica" no indica infertilidad masculina, sino que ese parámetro seminal está por debajo del quinto percentil del valor de ese parámetro en una población de referencia de varones fértiles. En otras palabras, que ese valor está por debajo del 95% de los valores que presentaban estos varones fértiles. En teoría, por la forma en la que se han obtenido (estadística de los parámetros en unos 2000 varones fértiles), es posible que los valores de referencia vayan actualizándose a medida que se vayan ampliando los estudios poblacionales. Pero, aparte de su utilidad para el diagnóstico de la pareja infértil, el seminograma, junto al resto de pruebas y reconocimientos, es una herramienta útil para tomar decisiones terapéuticas. El objetivo principal es valorar si la muestra, una vez capacitada, permite obtener el mínimo de millones de móviles progresivos para realizar uno u otro tratamiento de reproducción (inseminación artificial: IAH, Fecundación in Vitro: FIV o Microinyección Intracitoplasmática: ICSI). Podemos pensar que para una FIV estándar los nuevos valores de referencia no deberían modificar los valores internos que cada laboratorio establece según su protocolo de inseminación, sin embargo deberemos tener cuidado con muestras normozoospérmicas con valores en los límites inferiores de los diferentes parámetros, como ya hemos visto. Por su parte, la morfología sigue siendo un parámetro de dudosa utilidad clínica para evaluar un seminograma o derivar un paciente directamente a FIV/ICSI, y debe ser considerado en su justa medida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castilla JA, Alvarez C, Aguilar J, González-Varea C, Gonzalvo MC, Martínez L. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. Hum Reprod 2006; 21:847-851.

Chemes HE and Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. Hum Reprod Update 2003; 9:405-428.

Comhaire FH, Vermeulen L, Schoonjans F. Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen in vivo. Int J. Androl 1987; 10:653-662.

Cooper TG, Neuwinger J, Bahrs S, Nieschlag E. Internal quality control of semen analysis. Fertil Steril 1992; 58:172-178.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Gordon Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010; 16(3): 231-245.

Cooper TG, Yeung CH. Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. Fertil Steril 2006; 85:220-224.

Correa-Pérez JR, Fernández-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia. Fert Steril 2004; 81(4): 1148-1150.

Dunphy BC, Kay R, Barratt CL, Cooke ID. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. J Androl 1989; 10:378-385.

Garrido N, Meseguer M, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Impacto de los criterios estrictos de morfología espermática en reproducción Asistida. Cuadernos de Medicina Reproductiva Vol.11 Nº 1. Año 2005.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46:1118-1123.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49:112-17.

Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl A. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990; 5(5):586-92.

Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment. Historical perspectives and current opinions. J Androl 2001; 22:192-205.

Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change

in the interpretation of semen testing. Hum Reprod 1997a; 12:987-993.

Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E. External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. Fertil Steril 1990; 54:308-314.

Ombelet W, Wouters E, Bolees L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, et al. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and subfertile population. Int J Androl 1997b; 20: 367-372.

Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HWG, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. Fertil Steril 1988; 49:1052–1058.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999a, 128 p.

World Health Organization. Sperm collection and processing methods, Cambridge: Cambridge University Press, 1999b.

World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male, Cambridge: Cambridge University Press, 1999c

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

MediCult le ofrece calidad de producto, servicio e innovación.

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

MediCult
Innovation with Care

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL DE ANEUPLOIDÍAS: INDICACIONES, TÉCNICAS Y ESTRATEGIAS

Mariona Rius Mas [1,2], Laura Marquès Soler [1] y Joaquima Navarro Ferreté [2]
[1]Centre de Reproducció Assistida Clínica Sagrada Família
[2]Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona
e-mail: mrius@reproduccion-asistida.com; mariona.rius@uab.cat

El Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) fue desarrollado para poder seleccionar embriones libres de enfermedades monogénicas en un estadio previo a la implantación (Handyside et al., 1990). Para ello se requiere un procedimiento de fecundación in *vitro* que permita generar los embriones en el laboratorio.

Teniendo en cuenta que la aneuploidía es una de las causas más evidentes del fallo reproductivo humano y es responsable de síndromes compatibles con la vida, el concepto de selección preimplantacional pronto se adaptó para la detección de pérdidas o ganancias cromosómicas en los embriones, dando lugar al DGP para el cribaje de aneuploidías o PGS (*Preimplantation Genetic Screening*). El objetivo del PGS es incrementar la tasa de implantación, disminuir la tasa de aborto y evitar el nacimiento de individuos afectados por cromosomopatías en pacientes con especial riesgo.

Las primeras aplicaciones del PGS fueron llevadas a cabo por Verlinsky et al. (1995) y Munne et al. (1995) y consistieron en el análisis de los cromosomas cuyas alteraciones producen síndromes viables, es decir, X, Y, 13, 18 y 21, más el cromosoma 16, la alteración del cual se halla frecuentemente en abortos.

Desde de las primeras aplicaciones, el PGS se ha convertido en un análisis rutinario para pacientes en los que se sabe que la aneuploidía es uno de los factores causantes de la infertilidad. En la última recopilación de datos de la *European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium* se contabilizan 16342 casos de PGS desde Enero de 1997 hasta Diciembre de 2007 (Harper et al., 2010). Sin embargo, la tasa global de implantación de los embriones transferidos después de ser seleccionados es del 15% (embriones que muestran latido cardíaco respecto a los transferidos). Aunque cabe tener en cuenta que los datos proceden de centros de distintos países, con políticas de transferencia diferentes, esta realidad queda lejos de las esperanzas depositadas inicialmente en el PGS. De hecho, en los últimos años se ha generado una controversia en torno a la utilidad de esta estrategia: mientras algunos autores publican un incremento en la tasa de implantación de embriones de pacientes sometidos al PGS (Gianaroli et al., 1997; Munne et al., 1999, 2003), otros ponen de manifiesto que este sistema no es capaz de mejorar los resultados en mujeres de menos de 36 años (Staessen et al., 2008) o que incluso los empeora en mujeres de edad avanzada (Staessen et al., 2004; Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008).

Evaluando los resultados globales obtenidos hasta hoy, pues, es necesario hacer una reflexión sobre las estrategias utilizadas en el PGS, incidiendo en puntos esenciales como qué pacientes pueden beneficiarse del diagnóstico, qué técnica es la más idónea para el análisis cromosómico o en cuál estadio celular debe hacerse la biopsia.

INDICACIONES PARA EL PGS

EDAD MATERNA AVANZADA

Es bien sabido que a medida que aumenta la edad de la madre disminuye la tasa de implantación. Se han propuesto varios factores que podrían estar implicados en dicho declive, de los cuales los dos más aceptados son la disminución de la receptividad del útero y el envejecimiento de los ovocitos (Meldrum, 1993). No obstante, se han descrito tasas de embarazo elevadas en mujeres de edad avanzada receptoras de ovocitos de donantes jóvenes (Abdalla et al., 1993; Sauer et al., 1996), por lo que el primer factor no quedaría claramente asociado a este fenómeno. En cambio, existen muchas evidencias de la implicación ovárica en los problemas de fertilidad de mujeres de ≥ 37 años, especialmente de la elevada incidencia de aneuploidías en sus ovocitos (Nicolaidis y Petersen, 1998; Pellestor et al., 2003, 2005; Fragouli et al., 2006). Además, se han observado altas tasas de aneuploidía (40-80%) en embriones derivados de este grupo de pacientes (Gianaroli et al., 1997, 1999; Staessen et al., 2004; Platteau et al., 2005), independientemente de la morfología embrionaria. Por consiguiente, en mujeres de edad avanzada existe un elevado riesgo de no implantación, de aborto o incluso de tener descendencia que padezca síndromes originados por alteraciones cromosómicas. De hecho, se ha descrito un incremento exponencial de la incidencia del síndrome de Down con el aumento de la edad de la madre (Hassold y Jacobs, 1984). El riesgo también aumenta para el resto de trisomías viables (las de los cromosomas 13, 18, X e Y) (Warburton, 1986).

Parece evidente, pues, que la selección de embriones libres de alteraciones cromosómicas es una condición clave para aumentar el éxito reproductivo en este grupo de pacientes. Sin embargo, los resultados de distintos estudios clínicos aleatorizados (*randomized controlled trials*, RCT) de PGS en mujeres de edad avanzada son dispares: mientras algunos autores describen un claro incremento de la tasa de embarazo (Schoolcraft et al., 2010), otros no encuentran argumentos a favor del diagnóstico en términos de resultados clínicos por ciclo iniciado (Staessen et al., 2004; Mastenbroek et al., 2007; Hardarson et al., 2008; Schoolcraft et al., 2010). Sin embargo, algunos de estos estudios han sido

criticados por su diseño, es decir, por no incluir los pacientes adecuados, por el método de análisis utilizado, etc. (Munne et al., 2007). Como veremos más adelante, la estrategia utilizada para el cribado de aneuploidías puede influir enormemente en los resultados obtenidos.

ABORTOS DE REPETICIÓN

El término "abortos de repetición" se asigna a parejas que han sufrido dos o más abortos consecutivos. La prevalencia de este fenómeno en la población es del 1% y en el 50% de los casos no existe una causa aparente (Li et al., 2002). La presencia de alteraciones cromosómicas numéricas en abortos espontáneos (Hassold et al., 1980), así como su elevada incidencia (50-60%) en embriones de parejas con abortos de repetición no explicados (Pellicer et al., 1999; Rubio et al., 2003; Munne et al., 2005) hace pensar que, en estos casos, la aplicación del PGS podría ser beneficiosa. De todos modos, los estudios realizados hasta el momento son controvertidos y no está claro que la tasa de aborto pueda reducirse únicamente mediante una selección cromosómica (Werlin et al., 2003; Rubio et al., 2005; Munne et al., 2005), puesto que otros factores como la morfología embrionaria, la receptividad del endometrio o el sistema inmunitario podrían estar también implicados.

FALLOS RECURRENTES DE IMPLANTACIÓN

El término "fallos recurrentes de implantación" se asigna a pacientes que han realizado tres o más ciclos de FIV sin éxito o que no han conseguido el embarazo después de la transferencia de 10 embriones de buena calidad (en distintos ciclos de FIV) (ESHRE PGD *Consortium Steering Commitee*, 2002). Del mismo modo que en los abortos de repetición, se cree que pueden existir muchos factores causantes del fallo implantatorio. La elevada incidencia de aneuploidía es uno de ellos, pero también lo son una receptividad endometrial disminuida, patologías uterinas o incluso una técnica de transferencia embrionaria inadecuada (Donoso et al., 2007). Se encuentran pocos datos publicados, pero existe controversia: algunos estudios no muestran mejoría en los resultados clínicos del PGS (Gianaroli et al., 1999; Munne et al., 2003; Harper et al., 2006), mientras que otros describen tasas de implantación más elevadas (Pehlivan et al., 2003; Platteau et al., 2006).

FACTOR MASCULINO

El PGS también se recomienda a dos grupos en los que la aneuploidía parece tener un origen claramente masculino. El primer grupo es el de pacientes con azoospermia, obstructiva o no obstructiva, en los embriones derivados de los cuales se ha observado una elevada incidencia de alteraciones cromosómicas (Platteau et al., 2004; Rubio et al., 2005). El segundo grupo es el de pacientes con teratozoospermia severa, puesto que se ha detectado un número incrementado de aneuploidías en sus espermatozoides (Bernardini et al., 1998; Calogero et al., 2003). De todas formas, prácticamente no existen estudios que demuestren el efecto positivo del PGS sobre la tasa de implantación y embarazo en estos casos y, en consecuencia, se trata de una indicación minoritaria.

En cambio, el PGS sí se aplica a pacientes con resultados previos de Hibridación *in situ* Fluorescente (*Fluorescent in situ Hybridization*, FISH) alterada en espermatozoides o bien con resultados previos de meiosis alterada (Sanchez-Castro et al., 2009; Barri et al., 2005), independientemente de la calidad seminal.

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL PGS

HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE

En la mayoría de centros donde se practica el PGS, la estrategia más comúnmente utilizada es la biopsia de uno o dos blastómeros de los embriones en el día+3 del desarrollo y su posterior análisis citogenético mediante FISH. Esta técnica permite identificar algunos cromosomas predeterminados en el núcleo interfásico de la célula fijada. Consiste en la hibridación de sondas de DNA específicas (complementarias a determinadas regiones cromosómicas conocidas) marcadas con fluorocromos de colores distintos. Se trata de un procedimiento rápido y sencillo, ya que el tiempo de hibridación puede durar entre una y 14 horas, aproximadamente, y el análisis de los resultados se lleva a cabo de forma muy ágil. Otra de las ventajas de la técnica es que permite identificar y localizar la presencia del material cromosómico *in situ*, es decir, en la muestra examinada; esto permite re-biopsiar una segunda célula para evitar embriones sin diagnóstico. Pero la FISH también presenta limitaciones: para poder aplicarla es necesario fijar previamente el material nuclear en un portaobjetos. Este proceso requiere gran habilidad y experiencia, de lo contrario, puede ocasionar pérdidas de cromatina, que se interpretarán como falsas pérdidas cromosómicas. Además, el hecho de que la FISH detecte un único *locus* en cada cromosoma hace la estrategia menos robusta y más susceptible de producir errores de diagnóstico. En ocasiones, las señales fluorescentes pueden ser difíciles de interpretar: por ejemplo, señales dobles pueden corresponder a regiones replicadas de un cromosoma y, en consecuencia, tratarse de disomías; o bien a duplicaciones cromosómicas, que producen trisomías. Asimismo, solapamientos de DNA pueden ser interpretados como falsas monosomías.

Por los motivos anteriores, se recomienda llevar a cabo el reanálisis de los núcleos con señales dudosas utilizando sondas distintas a las iniciales. Esta estrategia ha permitido disminuir la tasa de error de la FISH hasta el 4,7%, siempre que se desarrolle el proceso en condiciones óptimas (Colls et al., 2007).

De todos modos, la mayor limitación de la técnica es el número de cromosomas que se pueden analizar en un PGS, un máximo de 13 (Abdelhadi et al., 2003), aunque rutinariamente se suelen estudiar 9 cromosomas (Pujol et al., 2003). Es decir, entre 11 y 15 de los 24 tipos de cromosomas existentes (1-22, X e Y) quedan sin analizar. Esto es debido a la restricción en el número de fluorocromos disponibles y a la probabilidad de solapamiento de las señales (Wilton, 2005). Por lo tanto, es necesario hacer varias rondas de hibridación para poder analizar más de cinco cromosomas (el número de

cromosomas que se puede estudiar en una sola ronda), aunque se ha descrito que en la tercera ronda se daña ya gran parte de la cromatina (Liu et al., 1998). Así pues, no es posible examinar todo el complemento cromosómico de una célula mediante la FISH.

Éste podría ser el principal motivo por el cual la tasa de implantación de los embriones seleccionados y transferidos después del PGS es menor que la esperada, como hemos apuntado anteriormente, del 15% según los datos recopilados por la ESHRE PGD *Consortium* (Harper et al., 2010). Y es por eso que la tendencia actual en el PGS es pasar a la utilización de técnicas que permitan estudiar simultáneamente los 22 cromosomas autosómicos más los dos sexuales.

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA

La Hibridación Genómica Comparada (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) es una de las técnicas mejor establecidas para el análisis completo del cariotipo humano. Fue descrita por Kallioniemi et al. en 1992 como método para detectar marcadores cromosómicos en el DNA tumoral. Posteriormente, su procedimiento se adaptó para el análisis de desequilibrios cromosómicos presentes en células aisladas, previa amplificación de su DNA (Voullaire et al., 1999; Wells et al., 1999).

El fundamento de la CGH reside en hibridar de forma competitiva, es decir, con una proporción 1:1, el DNA de una muestra problema (p.e., un blastómero aislado) y el de una célula control (p.e., un fibroblasto euploide) sobre metafases de linfocitos euploides (46,XY) fijadas en un portaobjetos. Antes de la hibridación, las muestras de DNA se marcan fluorescentemente con dos colores distintos, por ejemplo, en verde el DNA control y en rojo el DNA problema. Para la interpretación de los resultados es necesario disponer de un programa informático con el que capturar una docena de imágenes de metafases hibridadas por cada célula problema, realizar su cariotipo y evaluar la ratio entre las dos fluorescencias hibridadas en cada uno de los cromosomas. Si la intensidad de la fluorescencia para un cromosoma en concreto es igual en las dos muestras (control y problema), este cromosoma se visualiza en la metafase de color amarillo/naranja (verde + rojo). En cambio, si la intensidad de fluorescencia de la muestra problema es superior a la de la muestra control (rojo > verde) el cromosoma metafásico en cuestión se observará más rojo. Por el contrario, si la intensidad de fluorescencia de la muestra problema es inferior a la de la muestra control (rojo < verde) el cromosoma metafásico en cuestión se observará más verde. A partir de los resultados obtenidos, el programa informa de las ganancias y pérdidas de cualquier cromosoma, de modo que se obtiene un diagnóstico citogenético completo de la célula problema.

Así pues, la CGH permite analizar todos los cromosomas y en toda su longitud, siendo su límite de resolución de 10-20 Mb, por lo que, aparte de las alteraciones que afectan a todo el cromosoma, se pueden detectar también alteraciones parciales de los cromosomas. Además, la CGH aplicada al análisis de una sola célula tiene una gran ventaja: la célula analizada se introduce en un tubo de PCR para su lisis y posterior amplificación en vez de ser fijada en un portaobjetos. El éxito de diagnóstico mediante esta técnica es aproximadamente del 94% (Gutierrez-Mateo et al., 2004; Schoolcraft et al., 2010).

Sin embargo, la CGH también presenta limitaciones. Una de ellas es el hecho de que no permite detectar cambios de ploidía (triploidías, tetraploidías, etc.) ni tampoco permite distinguir entre euploidía y presencia de alteraciones cromosómicas equilibradas (aunque éstas no tienen significancia clínica). En cuanto al procedimiento, esta técnica requiere una gran especialización del personal que la realiza, tanto para el procesado de las muestras como para el análisis de los resultados. En la CGH convencional el tiempo necesario para llevar a cabo todo el proceso es de aproximadamente cuatro días, ya que la hibridación transcurre durante 40-72h; lo que implica la criopreservación de los embriones biopsiados en el PGD de blastómeros en día+3 y la transferencia de los seleccionados en un ciclo adicional posterior. Aunque las técnicas de vitrificación han incrementado el éxito de la criopreservación y la supervivencia de los embriones después de la descongelación, la situación ideal es evitar este proceso en el ciclo de FIV con PGS. Con esta finalidad, se ha desarrollado hace poco una versión modificada de la CGH convencional, la CGH rápida (Rius et al., 2010, 2011) con la que se obtienen los resultados en poco más de 24 horas, gracias a una reducción del tiempo de hibridación hasta 12 horas. Esta técnica rinde un éxito de diagnóstico del 94% (Rius et al., 2010). Al obtener los resultados el día+4, se puede realizar la transferencia "en fresco" de los embriones seleccionados en el mismo ciclo de FIV, evitando la criopreservación y el retraso de la transferencia embrionaria.

MICROARRAYS

Recientemente, la metodología de la CGH convencional se ha adaptado a la tecnología de los *microarrays*, lo que ha originado una nueva variedad de la CGH, el *array*-CGH (Hu et al., 2004; Le Caignec et al., 2006; Wells et al., 2008). Con esta estrategia, los DNAs problema y control no se hibridan sobre metafases de linfocitos fijadas en un portaobjetos común, sino que se utiliza un portaobjetos en el que se han adherido secuencias de DNA que cubren todo el genoma. Por tanto, el resultado de la CGH se obtiene evaluando la fluorescencia hibridada en cada uno de los puntos que contiene el *microarray*. Esta tecnología tiene dos ventajas respeto a la CGH convencional:

En primer lugar, la resolución es más elevada, ya que viene dada por el tamaño de las secuencias adheridas en el portaobjetos. Aun así, los criterios de análisis disponibles hasta el momento únicamente permiten detectar con seguridad alteraciones que involucren unas 10 Mb del cromosoma (Hellani et al., 2008; Vanneste et al., 2009). En segundo lugar, la duración del proceso puede llegar a ser de 16-18 horas y el análisis de los resultados se hace de forma automatizada, por lo que, al igual que con la CGH rápida, se puede hacer la transferencia de los embriones seleccionados durante el mismo ciclo de FIV. Actualmente ya se han llevado a cabo algunas aplicaciones clínicas del *array*-CGH (Hellani et al., 2008; Fishel et al., 2010) con resultados esperanzadores, a la vez que se avanza en la validación de la metodología (Gutierrez-Mateo et al., 2010) para asegurar la fiabilidad del diagnóstico en el PGS. El éxito de

diagnóstico mediante *array*-CGH es del 89% (Gutierrez-Mateo et al., 2010).

Otro sistema desarrollado con *microarrays* es el del *array*-SNPs, que puede ofrecer un análisis más completo del DNA problema (Handyside et al., 2009). Esta técnica utiliza un portaobjetos en el que se han adherido secuencias de DNA polimórficas, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), que se encuentran repartidas por todo el genoma. Con los *array*-SNPs, no sólo se puede determinar el número de copias de un cromosoma, sino que además se obtiene una "huella dactilar" única del DNA analizado, que identifica el genotipo de la muestra problema. En este caso, el DNA control y el problema se hibridan separadamente en distintas áreas de SNPs de un mismo portaobjetos y se puede utilizar el mismo fluorocromo para marcarlos. El número de copias de cada cromosoma se calcula comparando las intensidades de fluorescencia obtenidas para la hibridación control y la hibridación problema. El éxito de diagnóstico mediante *array*-SNPs es del 96% (Treff et al., 2010). Esta metodología podría tener un gran potencial de aplicación, pero a día de hoy una de las limitaciones más importantes es la falta de precisión en el diagnóstico. Para solucionar este problema, es necesario analizar un gran número de SNPs y realizar un procesamiento estadístico de los datos. Además, para poder comprender y valorar los resultados es necesario el análisis del DNA parental, lo que supone un proceso previo añadido. La complejidad del sistema hace que de momento su coste sea muy elevado y quede limitado a una pequeña parte de pacientes.

ESTADIO CELULAR Y MOSAICISMO

Uno de los temas más polémicos en el campo del PGS, a parte de la técnica utilizada, es el estadio celular en el cual debe realizarse el diagnóstico. Y la controversia ha surgido, principalmente, debido a la existencia de mosaicismo. El mosaicismo es la presencia de dos o más líneas celulares cromosómicamente distintas en un mismo embrión, y es un fenómeno muy común en embriones humanos (Munne et al., 1994a; Vanneste et al., 2009). Recopilando varios estudios de FISH, se ha visto que la proporción de embriones que presentan mosaicismo se encuentra entre el 25% y el 60% (Bielanska et al., 2002; Wilton, 2005). Aunque se cree que este fenómeno podría tener un predominio en embriones en estadio de día+3, se ha observado tanto en embriones de 6-8 células (Munne et al., 1994b; Delhanty et al., 1997), como en blastocistos (Evsikov y Verlinsky, 1998; Coonen et al., 2004; Daphnis et al., 2008). Por el hecho de que la célula diagnosticada puede tener una dotación cromosómica distinta a la del resto, el mosaicismo es uno de los principales obstáculos del PGS en embriones.

Una de las estrategias que está tomando de nuevo fuerza en el PGS es el análisis del primer y segundo corpúsculos polares (1CP, 2CP) (Verlinsky et al., 2001; Wells et al., 2002; Obradors et al., 2008, 2009, Kuliev et al., 2011). Estas dos células tienen una dotación cromosómica complementaria a la del ovocito en estadio de metafase II (MII), por lo que con su análisis se obtiene un diagnóstico indirecto de la composición cromosómica del ovocito. El estudio del gameto femenino se basa en que aproximadamente el 90% de las aneuploidías encontradas en los embriones son de origen materno (Nicolaidis y Petersen, 1998). Las principales ventajas de esta estrategia son que se analiza una célula que no interfiere en el desarrollo embrionario y, tanto con FISH como con CGH, se evita la criopreservación. Pero no pueden detectarse ni los errores cromosómicos de origen paterno, ni los errores mitóticos producidos en la etapa poszigótica, que generan mosaicismo en el embrión.

Sin embargo, la estrategia más comúnmente utilizada para el PGS en la actualidad es el análisis de blastómeros de los embriones en día+3. De hecho, según los datos recopilados por el ESHRE PGD *Consortium* (Harper et al., 2010), en el 83% de los casos de PGS se ha utilizado la biopsia de blastómero. Esta estrategia permite detectar alteraciones cromosómicas de origen tanto paterno como materno, así como posibles anomalías generadas en las primeras divisiones mitóticas del embrión.

Para poder detectar el mosaicismo, se ha propuesto realizar la biopsia y el análisis de dos blastómeros (Baart et al., 2006). Aunque se han descrito tasas de implantación aceptables siguiendo este método (Van de Velde et al., 2000), otros estudios recomiendan una estrategia menos invasiva, biopsiando un solo blastómero, ya que la biopsia de más de una célula puede comprometer la viabilidad del embrión (Goossens et al., 2008; De Vos et al., 2009).

Por otro lado, algunos autores argumentan que la constitución cromosómica de los blastómeros de embriones en día+3 podría no representar correctamente la del embrión que implanta (en estadio de blastocisto) (Li et al., 2005; Fragouli et al., 2008; Barbash-Hazan et al., 2009). En esta línea, se ha postulado que algunos embriones mosaicos con células euploides y aneuploides podrían llevar a cabo una autocorrección de las alteraciones cromosómicas mediante el crecimiento preferencial de las células euploides sobre las aneuploides, durante los primeros estadios de la embriogénesis y después de la implantación (Li et al., 2005; Barbash-Hazan et al., 2009). Contrariamente, otros estudios sugieren que estos embriones podrían acumular más alteraciones cromosómicas causadas por errores mitóticos (Munne et al., 2005; DeUgarte et al., 2008).

Independientemente de si existe corrección o acumulación de errores cromosómicos, recientemente se ha promocionado el análisis del trofoectodermo de blastocistos como estrategia de PGS, con el fin de obtener el diagnóstico del embrión en el momento más próximo a la implantación. En este caso, se podrían analizar varias células utilizando la FISH (McArthur et al., 2005), hecho que permitiría una mayor detección del mosaicismo. Pero consustancial a la FISH, reside el problema de la limitación en el número de cromosomas estudiados. Utilizando la CGH convencional, rápida o el *array*-CGH, se logra un análisis completo del cariotipo, aunque las 5-10 células del trofoectodermo que se obtienen por biopsia se procesan y analizan conjuntamente (Fragouli et al., 2008; Schoolcraft et al., 2010). Por un lado, el análisis de varias células juntas ofrece un diagnóstico más robusto; por otro lado, al obtener un resultado que representa una media de las distintas células, tampoco se puede descartar la presencia de mosaicismo. Se ha postulado que, con este método, sólo se detecta la aneuploidía que realmente podría tener una repercusión en el desarrollo del

embrión, y que alteraciones presentes en una frecuencia menor a un tercio de las células (no detectables mediante CGH) no tendrían relevancia clínica (Fragouli et al., 2008). Si esta hipótesis se confirma, el PGS aplicado al trofoectodermo podría representar una potente herramienta de selección embrionaria. Aparte, hay que tomar en consideración que el PGS aplicado a blastocistos no es apropiado para pacientes que producen embriones con poco potencial de desarrollo *in vitro* y se requiere la optimización del laboratorio de FIV para cultivar con éxito los embriones hasta el estadio de blastocisto. Otra limitación de esta estrategia es que requiere la criopreservación de los embriones biopsiados mientras se obtienen los resultados.

Como hemos visto, el diagnóstico de aneuploidías puede ser beneficioso en casos de edad materna avanzada, abortos de repetición, fallos repetidos de implantación y casos de factor masculino severo. Pero se debe tener en cuenta que existen muchos factores que contribuyen al éxito del PGS. Aunque tradicionalmente se ha utilizado la FISH como método de análisis por su sencillez y rapidez, la limitación en el número de cromosomas examinados ha hecho que se desarrollen otras estrategias para el estudio de todo el complemento cromosómico, como la CGH y su versión rápida, el *array*-CGH o el *array*-SNPs. Estas técnicas pueden aplicarse tanto para el análisis del primer y segundo corpúsculos polares, de blastómeros o bien de algunas células del trofoectodermo de los blastocistos. Cada estrategia presenta ventajas y desventajas respecto a las demás, si bien es verdad que ninguna de ellas evita el obstáculo del mosaicismo. La realización de estudios clínicos aleatorizados en que se prueben las nuevas metodologías, confirmarán si estas técnicas contribuyen a aumentar el éxito del PGS, incrementando la tasa de implantación de los embriones seleccionados y transferidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla HI, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA et al. Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. Hum Reprod 1993;8:1512-1517.

Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T and Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. Reprod Biomed Online 2003;6:226-231.

Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. Hum Reprod 2006;21:223-233.

Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. Fertil Steril 2009;92:890-896.

Barri PN, Vendrell JM, Martinez F, Coroleu B, Aran B and Veiga A. Influence of spermatogenic profile and meiotic abnormalities on reproductive outcome of infertile patients. Reprod Biomed Online 2005;10:735-739.

Bernardini L, Borini A, Preti S, Conte N, Flamigni C, Capitanio GL et al. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. Hum Reprod 1998;13:3406-3413.

Bielanska M, Tan SL and Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. Hum Reprod 2002;17:413-419.

Calogero AE, Burrello N, De Palma A, Barone N, D'Agata R and Vicari E. Sperm aneuploidy in infertile men. Reprod Biomed Online 2003;6:310-317.

Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J and Munne S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". Fertil Steril 2007;88:53-61.

Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M et al. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. Hum Reprod 2004;19:316-324.

Daphnis DD, Fragouli E, Economou K, Jerkovic S, Craft IL, Delhanty JD et al. Analysis of the evolution of chromosome abnormalities in human embryos from Day 3 to 5 using CGH and FISH. Mol Hum Reprod 2008;14:117-125.

De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. Hum Reprod 2009;24:2988-2996.

Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH and Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. Hum Genet 1997;99:755-760.

DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D and DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. Fertil Steril 2008;90:1049-1054.

Donoso P, Staessen C, Fauser BC and Devroey P. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. Hum Reprod Update 2007;13:15-25.

ESHRE PGD Consortium Steering Committee (2002) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III. Hum Reprod 2001;17:233-246.

Evsikov S and Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. Hum Reprod 1998;13:3151-3155.

Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? Fertil Steril 2010;93:1006 e1007-1006 e1010.

Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC et al. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. Hum Reprod 2006;21:2319-2328.

Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB and Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. Hum Reprod 2008;23:2596-2608.

Gianaroli L, Magli MC, Munne S, Fiorentino A, Montanaro N and Ferraretti AP. Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? Hum Reprod 1997;12:1762-1767.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP and Munne S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. Fertil Steril 1999;72:837-844.

Goossens V, De Rycke M, De Vos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. Hum Reprod 2008;23:481-492.

Gutierrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sanchez-Garcia JF, Bermudez MG, Belil I et al. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. Hum Reprod 2004;19:2118-2125.

Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. Fertil Steril 2010; [Epub ahead of print]

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K and Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature 1990;344:768-770.

Handyside AH, Harton GL, Mariani B, Thornhill AR, Affara N, Shaw MA et al. Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes. J Med Genet 2009;47:651-658.

Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. Hum Reprod 2008;23:2806-2812.

Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C et al. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. Hum Reprod 2006;21:3-21.

Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. Hum Reprod 2010;25:2685-2707.

Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet 1980;44:151-178.

Hassold TJ and Jacobs PA. Trisomy in man. Annu Rev Genet 1984;18:69-97.

Hu DG, Webb G and Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. Mol Hum Reprod 2004;10:283-289.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258:818-821.

Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J and Cieslak Janzen J. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. Reprod Biomed Online 2011;22:2-8.

Le Caignec C, Spits C, Sermon K, De Rycke M, Thienpont B, Debrock S et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. Nucleic Acids Res 2006;34:e68.

Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A and Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. Fertil Steril 2005;84:1395-1400.

Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E and Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. Hum Reprod Update 2002;8:463-481.

Liu J, Tsai YL, Zheng XZ, Yazigi RA, Baramki TA, Compton G et al. Feasibility study of repeated fluorescent in-situ hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. Mol Hum Reprod 1998;4:972-977.

Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. N Engl J Med 2007;357:9-17.

McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA and Jansen RP. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. Fertil Steril 2005;84:1628-1636.

Meldrum DR. Female reproductive aging--ovarian and uterine factors. Fertil Steril 1993;59:1-5.

Munne S, Weier HU, Grifo J and Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. Biol Reprod 1994a;51:373-379.

Munne S, Grifo J, Cohen J and Weier HU. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. Am J Hum Genet 1994b;55:150-159.

Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J and Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. Hum Reprod 1995;10:1014-1020.

Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. Hum Reprod 1999;14:2191-2199.

Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Reprod Biomed Online 2003;7:91-97.

Munne S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. Fertil Steril 2005;84:331-335.

Munne S, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J et al. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. Fertil Steril 2007;88:781-784.

Nicolaidis P and Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. Hum Reprod 1998;13:313-319.

Obradors A, Fernandez E, Oliver-Bonet M, Rius M, de la Fuente A, Wells D et al. Birth of a healthy boy after a double factor PGD in a couple carrying a genetic disease and at risk for aneuploidy: case report. Hum Reprod 2008;23:1949-1956.

Obradors A, Fernandez E, Rius M, Oliver-Bonet M, Martinez-Fresno M, Benet J et al. Outcome of twin babies free of Von Hippel-Lindau disease after a double-factor preimplantation genetic diagnosis: monogenetic mutation analysis and comprehensive aneuploidy screening. Fertil Steril 2009;91:933 e931-937.

Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C et al. Impact of

preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. Reprod Biomed Online 2003;6:232-237.

Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C and Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. Hum Genet 2003;112:195-203.

Pellestor F, Anahory T and Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. Cytogenet Genome Res 2005;111:206-212.

Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Minguez Y, Gimenez C, Egozcue J et al. In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. Fertil Steril 1999;71:1033-1039.

Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I et al. Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men. Hum Reprod 2004;19:1570-1574.

Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I and Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. Fertil Steril 2005;84:319-324.

Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I and Devroey P. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening? Reprod Biomed Online 2006;12:334-339.

Pujol A, Boiso I, Benet J, Veiga A, Durban M, Campillo M et al. Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. Eur J Hum Genet 2003;11:325-336.

Rius M, Obradors A, Daina G, Cuzzi J, Marques L, Calderon G et al. Reliability of short comparative genomic hybridization in fibroblasts and blastomeres for a comprehensive aneuploidy screening: first clinical application. Hum Reprod 2010;25:1824-1835.

Rius M, Daina G, Obradors A, Ramos L, Velilla E, Fernandez S et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. Fertil Steril 2011;95:413-416.

Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Hum Reprod 2003;18:182-188.

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

Sanchez-Castro M, Jimenez-Macedo AR, Sandalinas M and Blanco J. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. Hum Reprod 2009;24:1516-1521.

Sauer MV, Paulson RJ and Lobo RA. Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older. Hum Reprod 1996;11:2540-2543.

Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG and Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. Fertil Steril 2010;94:1700-1706.

Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M et al. 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;19:2849-2858.

Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I et al. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. Hum Reprod 2008;23:2818-2825.

Treff NR, Northrop LE, Kasabwala K, Su J, Levy B and Scott RT, Jr. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. Fertil Steril 2010; [Epub ahead of print]

Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, Staessen C, De Rycke M, Van Assche E et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn 2000;20:1030-1037.

Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. Nat Med 2009;15:577-583.

Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in situ hybridization. Hum Reprod 1995;10:1923-1927.

Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M et al. Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. Mol Cell Endocrinol 2001;183 Suppl 1:S47-49.

Voullaire L, Wilton L, Slater H and Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. Prenat Diagn 1999;19:846-851.

Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. Perinatal Genetics: diagnosis and treatment. In: Porter L, Willey A (eds), Academic press, New York 1986;133-148.

Wells D, Sherlock JK, Handyside AH and Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. Nucleic Acids Res 1999;27:1214-1218.

Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD and Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Fertil Steril 2002;78:543-549.

Wells D, Alfarawati S and Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. Mol Hum Reprod 2008;14:703-710.

Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marello E, Hill D and Munne S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. Fertil Steril 2003;80:467-468.

Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. Hum Reprod Update 2005;11:33-41.

¿Sabe que están haciendo **sus embriones** mientras duerme?

EmbryoScope™ Embryo Monitoring System
Monitorización contínua de los embriones en cultivo

EmbryoViewer™ Workstation
Sistema de gestión de datos en 4D

EmbryoSlide® Culture Dish
Condiciones de cultivo controladas

Sistema de Time-lapse
Observación permanente de los embriones para una mejor toma de decisiones

Cultivo sin interrupciones
Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

Evaluación flexible
En cualquier momento, en cualquier lugar, no se pierda nada

Información completa en 4D
Haga un mejor análisis teniendo toda la información

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

UNISENSE® FERTILITECH

QUERMED S.A.
tecnología médica

LifeGlobal
An IVFonline Company

IVFonline, LLC
Innovation & Quality

*Nuevo **Global Total™**, suplementado con Albúmina enriquecida con α y β Globulinas*

*Nuevo **LifeGuard™** Aceite de alta calidad con alta viscosidad para proteger el embrión humano*

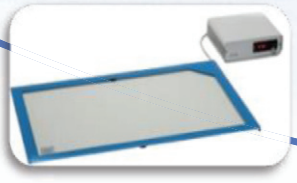
Sistema S3 para la Vitrificación de Blastocistos Humanos:
- No contiene DMSO
- Glicerol y Etileno Glicol, como Crioprotectores. Global w/ Hepes, como medio base
- Sistema de sellado cerrado, con pajuelas convencionales

Pipetas ICSI

Catéter de Transferencia Full Echo

Catéter de Transferencia Pearl Tip

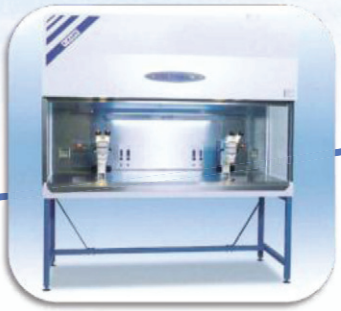
Agujas Punción OPS



Placas Calefectadas

Selladora por ultrasonidos

Baño en seco



Estación de trabajo

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

IMPLICACIÓN DE LA TÉCNICA MSOME EN CICLOS DE OVODONACIÓN

IMPLICATIONS OF MSOME METHOD IN OVODONATION CYCLES

Cristina Urda, Ana R. Díaz, Mª Carmen Cañadas, Vicente Badajoz, Silvia Camacho, Moisés de la Casa, Julio Gijón, Jose A. Gragera, Ricardo Bonache y Alberto Martínez de Arenaza
Clínica Ginefiv. Madrid
e-mail: c.urda@ginefiv.com
Fecha recepción: 29 Septiembre 2010 · Fecha aceptación: 23 Febrero 2011

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar si es posible una mejor selección espermática con la técnica MSOME. Para ello, se compararon de manera retrospectiva 245 ciclos de ovodonación, 119 con IMSI y 126 con ICSI. Todas las muestras usadas para la microinyección fueron diagnosticadas como teratozoospérmicas.
Nuestros resultados muestran que el uso de la técnica MSOME supone un aumento significativo de las tasas de implantación (grupo IMSI: 36%; grupo ICSI: 25%), así como de las de gestación (grupo IMSI: 55%; grupo ICSI: 38%). Concluimos, por tanto, que la técnica MSOME es una herramienta válida para seleccionar espermatozoides cuando trabajamos con muestras teratozoospérmicas. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):19-23.

Palabras clave: técnica MSOME, donación de óvulos, teratozoospérmicas, implantación, gestación.

SUMMARY

The aim of this study was to assess that if by applying the MSOME method a better sperm selection could be possible. To prove this, a comparative retrospective study was completed with a total of 245 ovodonation cycles, 119 with IMSI and 126 with ICSI. All the sperm samples used for the microinjection were diagnosed as teratozoospermia.
Our results show that implantation rates (IMSI group: 36%; ICSI group: 25%), and pregnancy rates (IMSI group: 55%; ICSI group: 38%) are significantly higher when the MSOME method is used. Therefore, in conclusion, we identify the MSOME method as a valid tool for spermatozoa selection in samples with teratozoospermia. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):19-23.

Keys words: MSOME method, oocyte donation, teratozoospermia, implantation, pregnancy.

INTRODUCCIÓN

Tras el desarrollo del MSOME (Evaluación de la Morfología de los Orgánulos de Espermatozoides Móviles), la morfología normal del núcleo espermático fue definida por la forma simétrica y oval, por la textura lisa, así como por el contenido de una masa cromática homogénea sin presencia de invaginaciones, intrusiones y con menos del 4% del área nuclear ocupado por vacuolas. Según Bartoov et al. (2002), con menos de un 20% de espermatozoides con núcleo morfológicamente normal, no se conseguían embarazos a término, demostrando la gran importancia de la forma y contenido del núcleo espermático en los resultados de un ciclo. Una pequeña desviación de la morfología de la cabeza puede llegar a dar embarazo; sin embargo, superar el umbral de vacuolas establecido por Bartoov et al., en 2002, puede acabar en aborto (Berkovitz et al., 2005) y se ha correlacionado con una menor capacidad de desarrollo hasta blastocisto (Vanderzwalmen et al., 2008).

La presencia de vacuolas puede reflejar defectos moleculares responsables de las anomalías que se producen en el empaquetamiento de la cromatina del espermatozoide durante la maduración espermática, y por lo tanto hacer al espermatozoide más vulnerable a sufrir daños en su ADN e interferir en el desarrollo embrionario a partir del día 3 de desarrollo (Cayli et al., 2003; Vanderzwalmen et al., 2008). Aunque no se han observado diferencias significativas en las calidades embrionarias al comparar grupos ICSI-IMSI (Hazout et al., 2006; Mauri et al., 2008) o grupos IMSI entre sí (Berkovitz et al., 2006a), los resultados en términos de implantación y embarazo han sido significativamente mejores en los ciclos donde se realizaba una selección espermática más estricta (Antinori et al., 2008; Bartoov et al., 2003; Berkovitz et al., 2005, 2006a,b; Hazout et al., 2006; Mauri et al., 2008).

La fragmentación del ADN se ha posicionado como un parámetro objetivo y fácil de diagnosticar, siendo responsable de muchos de los fallos de ICSI por factor masculino (Evenson et al., 2002). La presencia de grandes vacuolas en la cabeza espermática, se ha relacionado con mayores tasas de fragmentación (Franco et al., 2008), así como con una peor función mitocondrial y existencia de aneuploidias (Garolla et al., 2008).

En parejas con oligoastenoteratozoospermias severas y elevada fragmentación de ADN se ha visto que la utilización del IMSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados

morfológicamente), después de 2 o más ciclos fallidos de FIV-ICSI, supone un aumento significativo en las tasas de embarazo e implantación, así como una reducción en las tasas de abortos cuando se compara con grupos controles donde se realiza microinyección convencional (Antinori et al., 2008; Bartoov et al., 2003; Berkovitz et al., 2006b; Hazout et al., 2006). Sin embargo, para Berkovitz et al. (2005) los resultados del primer ciclo ya están condicionados por la morfología espermática. En este sentido, el MSOME permite excluir, en la selección para ICSI, a espermatozoides con defectos nucleares y disminuye la probabilidad de inyectar ovocitos con ADN dañado (Vanderzwalmen et al., 2008).

Basándonos en esta revisión bibliográfica, el objetivo de este estudio, unicéntrico y retrospectivo, fue demostrar que una selección más estricta de los espermatozoides mediante la óptica del MSOME, mejora los resultados de ciclos de ovodonación cuando trabajamos con muestras teratozoospérmicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron de forma retrospectiva 245 ciclos de ovodonación llevados a cabo en nuestro centro en el año 2009. Por petición de las pacientes, en 119 ciclos se realizó IMSI, mientras que en los 126 ciclos restantes, ICSI. Todas las muestras usadas para la microinyección fueron diagnosticadas como teratozoospérmicas.

Metodología FIV-ICSI. Las receptoras se sometieron a supresión hipofisaria, y/o preparación endometrial con estrógenos. La fase lútea se apoyó con dosis de progesterona, vía oral o vía vaginal. Confirmada la gestación, la administración de estrógenos y progesterona se mantuvo hasta un máximo de 100 días. Tras el frenaje ovárico de la donante, la estimulación ovárica controlada comenzó con dosis de FSHr (100UI-225UI), en pauta con antagonistas. La punción ovárica se programó con la visualización de 2-3 foliculos superiores a 17mm, administrando bolo de GnRH análogo 32/48 horas previas a la punción ovárica.

Las muestras seminales fueron obtenidas por masturbación. Se diagnosticaron siguiendo los parámetros de la OMS 1999 y se procesaron en un periodo máximo de 1 hora, manteniéndolas siempre a 37ºC. Si las muestras eran criopreservadas, para la congelación se utilizó criopreservante Sperm Frezee™ Ferti Pro. La capacitación se hizo mediante columnas de gradientes con medios de cultivo de la serie VITROLIFE.

Tras la punción, la recuperación y decumulación de los complejos cúmulo-ovocito, se realizó la microinyección siguiendo el protocolo habitual. Los ovocitos microinyectados se cultivaron de forma individualizada, hasta el día de la transferencia, en placas NUNC IVF 35x10 utilizando medios de cultivo VITROLIFE.

A las 18-20h post inseminación, se evaluó la fecundación mediante la visualización de 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares. La tasa de fecundación se calculó considerando los ovocitos correctamente fecundados, respecto del total inseminados. La división de los zigotos se evaluó y categorizó siguiendo las pautas de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). El porcentaje de embriones de calidad A+B se calculó respecto al número total de embriones viables en día 3 de desarrollo. En este mismo día se realizó la transferencia en todos los casos.

A los 14 días de la transferencia ecoguiada se realizó la β-hCG para confirmar embarazo. Se consideró gestación clínica la visualización de latido cardiaco. Cuando la gestación no llegó a término fue considerada aborto. El porcentaje de implantación se calculó tomando el número de sacos gestacionales respecto al total de embriones transferidos; y el porcentaje de gestación considerando el número de embarazos clínicos respecto al total de transferencias realizadas. El número de abortos representa el número de embarazos no llegados a término respecto al total de gestantes.

Selección espermática. En el grupo IMSI, la selección espermática se hizo a temperatura ambiente y con microscopio invertido Nikon Eclipse T*i* acoplado al sistema MSOME, utilizando placas 50x40 Willco-Dish. Se siguieron los criterios y el protocolo de Bartoov et al., 2002, 2003.

El sistema MSOME está basado en cuatro parámetros principales: un objetivo de 100x, un selector de aumento de 1,5x, un acoplador de magnificación de 0,99x acoplado a una cámara, y un magnificador de la imagen de 44,45x, mediante el cual la morfología espermática puede ser visualizada a 6600 aumentos (100 x 1.5 x 0.99 x 44.5) sin necesidad de tinción y a tiempo real (Bartoov et al., 2002).

En el grupo ICSI, la selección se llevó a cabo bajo el objetivo 40x en un microscopio Nikon Eclipse TE2000S con placa calefactada a 37ºC.

Estudio estadístico. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS XVI. Se utilizó un estadístico de contraste, la prueba de independencia de χ^2, estableciendo como nivel de significación el p valor 0,05.

RESULTADOS

1. Muestras seminales.

Grupo IMSI. En el 68% (81) de los ciclos las muestras procedieron de eyaculados congelados y en el 32% (38) de eyaculados frescos. Dentro de las muestras congeladas, el 59% (48) presentaron astenozoospermia y teratozoospermia y el 41% (33) oligoastenozoospermia y teratozoospermia. En las muestras en fresco, el 39% (15) presentó astenozoospermia y teratozoospermia, y el 61% (23) oligoastenozoospermia.

Grupo ICSI. En el 73% (92) de los ciclos las muestras procedieron de eyaculados congelados y en el 27% (34) de eyaculados frescos. El 56% (52) de las muestras congeladas presentaron astenozoospermia y teratozoospermia, y el 44% (40) oligoastenoteratozoospermia. El 41% (14) de los eyaculados frescos presentaron asteno y teratozoospermia, y el 59 % (20) oligoastenozoospermia y teratozoospermia.

No se han observado diferencias significativas entre la utilización de muestras congeladas y frescas entre ambos grupos, al igual que tampoco las ha habido al comparar la calidad seminal; p>0,05, Tabla 1.

2. Resultados FIV-ICSI.

Grupo IMSI. Se inseminaron 1492 ovocitos. La tasa de fecundación (2PN y 2CP) fue del 62%. El número de embriones totales el día de la transferencia fue de 5,5 ± 2,5 por paciente. En 115 (96%) ciclos se hizo transferencia. De las 5 (4%) pacientes que transfirieron un único embrión, 4 fueron transferencias selectivas. En total, se transfirieron 225 embriones, siendo el 54% embriones de categoría A+B. El 36% de los embriones transferidos fue capaz de implantar. En el 30% (19) de los ciclos se visualizaron dos sacos gestacionales. En total 63 pacientes quedaron gestantes, terminando 13 en aborto.

Grupo ICSI. Se inseminaron 1508 ovocitos. La tasa de fecundación en 2PN y 2CP fue del 60%. La transferencia se llevo a cabo en 117 (93%) ciclos, en 6 de los cuales (5%) se transfirió un solo embrión (5 fueron transferencias selectivas). De los 228 embriones viables el día de la transferencia, el 58% fueron de categoría A+B. El 25% de los embriones transferidos consiguieron implantar. Similar al grupo IMSI, en el 29% (13) de los casos se confirmó gestación múltiple. Hubo 45 gestaciones y 7 no lograron llegar a término.

No se han observado diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los siguientes parámetros: tasa de fecundación, calidad embrionaria (tipo A+B) y número de embriones transferidos; p>0,05. Se observaron diferencias significativas entre las tasas de implantación (36% en el grupo IMSI; 25% en el grupo ICSI; p<0,05), al igual que en la tasa de gestación (55% grupo IMSI; 38% en el grupo ICSI; p<0,01). La tasa de embarazo múltiple, aunque no se estudió mediante un cálculo estadístico, aparece equiparable entre ambos grupos. Respecto a la tasa de aborto, aunque se observa una tendencia al alza en el grupo IMSI, no se vieron diferencias significativas entre ambos grupos; p>0,05. Tabla 2.

	Congelado	Fresco
Grupo IMSI	81(68%)	38(32%)
Grupo ICSI	92(73%)	34(27%)

CONGELADAS	AT	OAT	FRESCAS	AT	OAT
Grupo IMSI	48(59%)	33(41%)		15(39%)	23(61%)
Grupo ICSI	52(56%)	40(44%)		14(41%)	20(59%)

Tabla I. *Porcentaje de muestras con teratozoospermia utilizadas considerando la procedencia (congelado y fresco), y la motilidad y concentración. AT:Astenoteratozoospermia: OAT: Oligoastenoteratozoospermia.*

DISCUSIÓN

El efecto paterno ha sido valorado en los ciclos de FIV-ICSI usando como modelo la recepción ovocitaria (Tesarik, 2005). Con la introducción del MSOME, se han desarrollado estudios retrospectivos (Berkovitz et al., 2006a), prospectivos (Antinori et al., 2008; Bartoov et al., 2002) y/o randomizados (Mauri et al., 2008), con el fin de poder testar los beneficios de la IMSI en los resultados de un ciclo de FIV. Sin embargo, este estudio es el primero en el que se comparan de forma retrospectiva ciclos de IMSI e ICSI utilizando un modelo de ovodonación.

En todos los casos, las muestras seminales tuvieron más de dos parámetros afectados, siendo la teratozoospermia el diagnóstico común. Los datos, analizados estadísticamente, muestran que las diferencias obtenidas entre los grupos IMSI e ICSI no están influenciadas ni por la procedencia de la muestra (congelada o fresca), ni por los parámetros de motilidad y concentración. Todos los ciclos se realizaron en el mismo periodo de tiempo, bajo idénticas condiciones de selección de pacientes, estimulación ovárica, calidad espermática y equipo material y humano. La única diferencia entre grupos fue el tipo de óptica y el protocolo para la selección de los espermatozoides. Teniendo en cuenta que la morfología espermática se ha posicionado como un parámetro clave para predecir los resultados de un ciclo de reproducción asistida (Bartoov et al., 1994, 2002, 2003; De Vos et al., 2003), nuestros datos nos llevan a proponer la técnica del MSOME como una herramienta válida para llevar a cabo la selección espermática previa a la microinyección.

	Grupo IMSI (n=119)	Grupo ICSI (n=126)
Inseminados	1452	1508
Fecundados	62% (926)	60% (908)
Embriones totales	71% (653)	74% (671)
Categorías A+B	54%	58%
Embriones transferidos	225 (1.89±0.4)	228 (1.81±0.5)
Implantados	36% (82) [a]	25% (58) [b]
Gestaciones	55% (63) [a]	38% (45) [b]
Abortos	21% (13)	16% (7)

Tabla II. *Estudio comparativo entre IMSI e ICSI. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre columnas (p<0,05).*

La literatura y nuestra propia experiencia sugieren que existen malformaciones en el espermatozoide capaces de dar lugar a embarazos, incluso en casos de teratozoospermia total (Berkovitz et al., 2005). Sin embargo, el aumento significativo de las tasas de implantación y gestación en el grupo IMSI apoyan la idea de que a 400 aumentos existen defectos que no pueden ser detectados (Bartoov et al., 2002). Al igual que otros estudios, podemos concluir que una buena morfología espermática, así como intentar microinyectar espermatozoides libres de vacuolas nucleares, aumenta las posibilidades de éxito (Berkovitz et al., 2006a; Hazout et al., 2006; Vanderzwalmen et al., 2008).

La evaluación con MSOME de muestras con indicación para ICSI, muestra que solamente el porcentaje de espermatozoides vacuolados se sitúa en torno al 40% (Berkovitz et al., 2006a), y en el 22% de los casos no es posible encontrar ningún espermatozoide morfológicamente normal (Bartoov et al., 2003), aunque otros autores documentan que esto ocurre en el 50% de los casos (Vanderzwalmen et al., 2008).

En nuestro laboratorio, el porcentaje de vacuolización de las muestras usadas para ICSI no fue valorado previamente con MSOME, pero, si tenemos en cuenta lo anteriormente expuesto, la probabilidad de seleccionar espermatozoides con un bajo potencial implantatorio es más alta en el grupo ICSI. De esta manera, apoyamos que una mejor selección supone una mejora de resultados (Bartoov et al., 2002), y que la calidad de la muestra no es representativa del espermatozoide seleccionado (De Vos et al., 2003).

Estudiando espermatozoides de manera individualizada, se ha relacionado la morfología con bajas tasas de implantación y embarazo, y, a su vez, con defectos cromosómicos que pudieran ser transferidos al embrión (De Vos et al., 2003; Garolla et al., 2008). La zona pelúcida presenta una alta sensibilidad a ser penetrada por espermatozoides portadores de anomalías cromosómicas (Liu and Baker et al., 2007), pero en ciclos de microinyección se llegan a conseguir buenas tasas de fecundación y calidad embrionaria, aún microinyectando con muestras con elevada fragmentación en el ADN espermático (Larson et al., 2000). Pero, eliminar esta selección natural puede jugar un papel importante en el desarrollo embrionario (Vanderzwalmen et al., 2008).

Usando un modelo de donación de ovocitos se han distinguido dos tipos de efectos paternos: un efecto temprano implicado en el proceso post-fecundación, visible en el estadio de pronúcleos, y un efecto tardío que, sin producir alteraciones en la velocidad de desarrollo y morfología embrionaria, haría disminuir las tasas de implantación (Tesarik et al., 2004, 2005). El efecto paterno tardío ha sido relacionado con los daños en el DNA, provocando que la expresión genómica embrionaria se paralice alrededor de las 72 horas post-fecundación (Vanderzwalmen et al., 2008).

Independientemente de la óptica usada para la selección espermática (Hoffman o Nomarski), la tendencia ha sido observar igualdad en las tasas de fecundación y calidades embrionarias, pero microinyectar con espermatozoides anormales, y sobre todo cuando éstos presentan alta vacuolización, genera embriones con bajo potencial implantatorio (Antinori et al., 2008; Berkovitz et al., 2006a; Hazout et al., 2006; Mauri et al., 2008). Nuestros resultados no difieren de los mostrados por estos autores, las tasas de fecundación se mantienen similares entre ambos grupos (grupo IMSI: 62%; grupo ICSI: 60%), a igualdad de embriones transferidos (grupo IMSI: 225; grupo ICSI: 228) y calidades embrionarias tipo A+B (grupo IMSI: 54%; grupo ICSI: 58%), y aunque observamos una tendencia al alza respecto a la calidad embrionaria en el grupo ICSI, las diferencias observadas suponen un aumento del 11% en las tasas de implantación (grupo IMSI: 36%; grupo ICSI: 25%) y un 17% en las de gestación (grupo IMSI: 55%; grupo ICSI: 38%) en el grupo IMSI. En relación a la disminución de los abortos, expuesto por otros autores cuando se realiza IMSI, la única explicación es pensar que cuando se realizó el estudio estadístico, más de la mitad de los embarazos no habían llegado a término, lo que nos lleva a no observar diferencias significativas.

La IMSI podría ser un buen método para excluir de la selección a espermatozoides vacuolados que pudiesen portar algún tipo de anomalía cromosómica responsable del mal desarrollo embrionario. Sin embargo, la técnica se enfrenta a los inconvenientes de suponer una inversión económica por parte del centro para la adquisición del equipo, y una puesta a punto de la técnica por parte del equipo humano del laboratorio, además de un aumento significativo del tiempo empleado por caso para la selección de espermatozoides.

Optimizar la selección de gametos es la mejor herramienta con la que contamos los embriólogos, por lo que proponemos el MSOME como un buen método de selección espermática, mediante el cual podemos ofrecer a las parejas una técnica de microinyección más pulida. Y concluimos que, en nuestro laboratorio, el MSOME ha supuesto una ventaja para parejas que se someten a ciclos de ovodonación con muestras teratozoospérmicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d´Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. Reproductive BioMedicine online 2008; 16:835-841.

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

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Real-Time fine morphology of motile human sperms cells is associated with IVF-ICSI outcome. Journal of Andrology 2002; 23:1-8.

Bartoov B, Eltes F, Pansky. Improved diagnosis of male fertility potential via a combination of quantitative ultramorphology and routine semen analysis. Human Reproduction 1994; 9:2069-2075.

Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? Human Reproduction 2006a; 21:1787-1790.

Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, et al. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. Reproductive BioMedicine online 2006b; 12(5): 634-638.

Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr Ilya, Fishman A, et al. The morphological normalcy of sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. Human Reproduction 2005; 12(1):185-190.

Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. Reproductive BioMedicine online 2003; 7(4):462-468.

De Vos A, Van de Velde H, Joris H. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility 2003; 79(1): 43-48.

Evenson D.P, Kjersten L. Larson. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentacion in male infertility and comparisons with other techniques. Journal of Andrology 2002; 23:25-43

Franco JG, Jr., Baurffi RLR, Mauri AL. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implication for ICSI. Reproductive BioMedicine online 2008; 17(1): 42-45.

Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, et al. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. Reproductive BioMedicine online 2008; 17(5):610-616.

Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca A-M. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. Reproductive BioMedicine online 2006; 12(1):19-25.

Larson K, DeJonge C, Barnes A. Relationship of assisted reproductive technique (ART) outcomes with sperm chromatin integrity and maturity as measured by sperm chromatin structure assay (SCSA). Human Reproduction 2000; 15:1717-1722.

Liu D, Baker H. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an expected adverse effect. Human Reproduction 2007; 22:1597-1602.

Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JBA. Comparation of day 2 embryo quality after ICSI versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) using sibling oocytes. Human Reproduction 2008; 23(Suppl.1):i70-i72.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human preimplantation development after ICSI. Human Reproduction 2004; 19(3):611-615.

Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. Reproductive BioMedicine online 2005; 10(3):370-375.

Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. Reproductive BioMedicine Online 2008; 17(5):617-627.

World Health Organization 1999 WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interation, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.

BioCare Europe

Tu compañero en la clínica FIV

Te ofrece el laboratorio al completo

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

SAGE® IVFtech SANYO KITAZATO® RI TPC Rocketmedical nunc™

BioCare Europe
ITALIA • ESPAÑA • FRANCE • GREECE • SWITZERLAND • PORTUGAL
Viale Regina Margherita, 262 - 00198 Roma (Italia) - Tel. 900 99 39 36- Fax +39 06 44240358
www.biocareeurope.com

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA: ANÁLISIS EN PACIENTES DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

INFLUENCE OF PHYSICAL ACTIVITY AND BODY MASS INDEX ON SPERM QUALITY: ANALYSIS IN ASSISTED REPRODUCTION PATIENTS

Marta Campos Guarnizo[1], Elena Delgado Niebla[1], Sara Morgado García[2], Beatriz Sánchez-Correa[2], Mª Rosario Gonzáles Roncero[2], Juan Gordillo Gonzálvez de Miranda[2], José DeJulián y Fernández de Velasco[1], Raquel Tarazona Lafarga[2], Javier García Casado[2,3]
[1]Norba, Ginecología y Reproducción S.L., Cáceres, España. [2]Universidad de Extremadura, Departamento de Fisiología, Área de Inmunología, Cáceres, España. [3]Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Terapia Celular, Cáceres, España.
e-mail: jgarcia@ccmijesususon.com
Fecha recepción: 27 Marzo 2011 · Fecha aceptación: 26 Abril 2011

RESUMEN

En este trabajo, hemos analizado un amplio grupo de varones que acuden con sus parejas a nuestro centro para someterse a un tratamiento de reproducción asistida. El análisis de los diferentes parámetros de fertilidad ha demostrado que los varones con hábitos de práctica deportiva presentan un incremento en el volumen de eyaculado, concentración de espermatozoides y movilidad espermática respecto a los que tienen una actividad física ocasional o unos hábitos de vida sedentarios. Además, el porcentaje de muestras normozoospérmicas en el grupo de varones con hábitos de vida deportiva fue significativamente superior al resto de los grupos. Por otro lado, al agrupar los varones en función del índice de masa corporal, se comprobó que el recuento de espermatozoides móviles estaba disminuido en varones preobesos u obesos en grado I. Finalmente, el porcentaje de varones con alguna anomalía espermática está incrementado en los preobesos y en los obesos de grado I. En resumen, los resultados de este trabajo demuestran que la actividad física y el índice de masa corporal son factores directamente relacionados con la calidad espermática de los varones. Sería aconsejable recomendar dieta y ejercicio a aquellos varones que se sometan a tratamientos de reproducción asistida. Además estos factores podrían ser empleados como un criterio de selección previo a la donación de espermatozoides. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):25-32.

Palabras clave: Ejercicio, Índice de masa corporal, Calidad espermática

SUMMARY

In this work, we have analysed a group of male patients from couples who undergo fertility treatment in our Center for Assisted Reproduction. The analysis of semen parameters has demonstrated that male patients with regular physical activity show an increased ejaculation volume, sperm concentration as well as increased sperm motility in comparison with patients with a sedentary lifestyle or patients with occasional physical activity. Moreover, the percentage of normozoospermic patients with regular physical activity was significantly higher compared with other patients. On the other hand, patients were grouped according to their Body Mass Index. In this analysis, we found that the recovery of motile sperm is decreased in pre-obese and obese class I patients. In addition, the percentage of patients diagnosed with spermatic anomalies was increased in pre-obese and obese class I patients. Diet and exercise could be recommendable when patients are involved in reproductive treatment. In summary, our results demonstrate that physical activity and Body Mass Index are directly related with the sperm quality. These two factors should be considered for the previous selection of sperm bank donors. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1): 25-32.

Key Words: Exercise, Body Mass Index, Sperm quality

INTRODUCCIÓN

El significativo aumento de la infertilidad masculina en los países desarrollados en los últimos años ha incrementado el interés en el estudio de los factores que pueden afectar al descenso de la calidad seminal. Los cambios socioeconómicos y la adquisición de nuevos hábitos de vida podrían ser la explicación a dicho descenso. Aunque en algunos hombres la infertilidad se debe a algún tipo de desorden, en la mayoría de los casos no existe una causa aparente de infertilidad (Sharpe, 2000), de hecho, en numerosas ocasiones se encuentran buenos parámetros de calidad espermática pero una baja tasa de fecundación (Ivorra et al., 2008). Probablemente no exista un solo agente responsable de la infertilidad masculina, sino que son múltiples los parámetros (estilos de

vida, condiciones medioambientales o la situación socioeconómica del individuo) que determinan la creciente infertilidad en el hombre (Tas et al., 1996).

Numerosos estudios hablan sobre el estilo de vida en los países desarrollados y en vías de desarrollo y cómo éste afecta la fertilidad de la población (Robbins et al., 2005). La dieta, el ejercicio físico y las emociones son parámetros importantes en el individuo, que afectan directamente a la fisiología del testículo. Las dietas pobres en frutas o verduras, insuficientes en antioxidantes naturales, el exceso de conservantes, de antioxidantes sintéticos (Amaral and Ramalho-Santos, 2009; Delbes et al., 2010) y el exceso de cafeína (Jensen et al., 2010), entre otros, producen alteraciones hormonales que afectan a la fertilidad masculina. En los últimos años, una de las consecuencias de la mala alimentación es el aumento de la obesidad, que podría considerarse como un factor asociado a la infertilidad masculina. Hay estudios que relacionan la obesidad (Cabler et al., 2010) con el aumento de la temperatura testicular, produciendo la alteración de la espermatogénesis (Hjollund et al., 2000) y la subsiguiente infertilidad del individuo.

Por otro lado, el deporte está considerado un buen hábito de vida; sin embargo, hay estudios que relacionan diferentes tipos de entrenamientos con la calidad seminal. De hecho, el deporte al más alto nivel también podría comprometer la fertilidad masculina (Vaamonde et al., 2009; Safarinejad et al., 2009). Además, un estilo de vida o una actividad profesional sedentaria puede provocar el aumento de la temperatura testicular; no obstante, en diferentes estudios realizados, hay datos contradictorios entre sedentarismo y mala calidad espermática (Bonde and Storgaard, 2002; Stoy et al., 2004). Por todo ello, consideramos necesario que se hagan estudios epidemiológicos restringidos a aquellas parejas con problemas de fertilidad que acuden a centros de reproducción asistida. Estos estudios nos permitirían determinar más concretamente los factores causales asociados a la infertilidad.

En este trabajo, hemos analizado un amplio grupo de varones que acuden con sus parejas a un centro de reproducción asistida para someterse a un tratamiento de infertilidad. En el análisis de los diferentes parámetros de fertilidad, se ha observado que los varones con hábitos de práctica deportiva presentan un incremento en la movilidad espermática respecto de varones con hábitos deportivos ocasionales o sedentarios. En los varones con alto índice de masa corporal (pre-obesos u obesos en grado I) se observó un descenso en el parámetro R.E.M. (recuento de espermatozoides móviles). Además, el porcentaje de varones normozoospérmicos fue superior en el grupo de varones con hábitos de vida deportiva y con índice de masa corporal normal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se obtuvieron de pacientes (n=106) que acudieron a Clínica Norba Ginecología y Reproducción para someterse a un tratamiento de fertilidad. La recogida de la muestra se realizó mediante masturbación, requiriéndose de 3 a 5 días de abstinencia sexual. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura cumpliendo con los principios enunciados en la declaración de Helsinki.

1.2. MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de semen se dejaron licuar entre 20 y 40 minutos antes de analizar el volumen, viscosidad, licuefacción, pH, número, movilidad, vitalidad espermática, presencia de células redondas, morfología y R.E.M, y se clasificaron según los parámetros de referencia propuestos por la Organización Mundial de la Salud publicados en 2010 (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth edition, 2010).

2. VALORES DE REFERENCIA DE LA OMS

Según el manual de la OMS del año 2010, el volumen de eyaculado de una muestra normal tiene que ser superior a 1,5 ml, la concentración espermática debe ser ≥ de 15 millones/ml o ≥ de 39 millones en el eyaculado total. El número de espermatozoides con movilidad progresiva a + b debe ser ≥32%. Los valores normales de morfología espermática deben ser ≥ a 4% de espermatozoides normales, siguiendo el criterio estricto de Kruger (Menkveld and Kruger, 1995, Kruger and Coetzee, 1999) y el número normal de espermatozoides vivos debe ser ≥ 58%.

3. RECUENTO DE ESPERMATOZOIDES MÓVILES

Las muestras fueron procesadas utilizando la técnica de *swim-up*. En resumen, el semen licuado se mezcló en igual proporción con el medio de lavado Sperm (Origio) y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min. Al pellet con los espermatozoides y restos celulares se le añadió 1 ml de medio Sperm (Origio, Jyllinge, Denmark) y se incubó a 37ºC y 5% de CO_2 durante 1 hora. El fundamento de la técnica consiste en que los espermatozoides móviles suban hacia el medio mientras que los inmóviles y restos celulares quedan en el pellet. El sobrenadante se recogió, se lavó con medio IVF (Origio) a 500 x g 10 minutos y se resuspendió en el mismo medio. El R.E.M se obtuvo calculando el número de espermatozoides móviles por el volumen del medio en el que están resuspendidos.

4. FACTORES RELACIONADOS CON EL PACIENTE

4.1. HÁBITOS DE PRÁCTICA DEPORTIVA

Para poder relacionar la actividad física con los parámetros seminales, un total de 94 pacientes fueron agrupados en función de los hábitos de práctica deportiva que desarrollaban. Los individuos definidos como sedentarios eran aquellos varones que semanalmente no realizaban ninguna actividad física. Los individuos definidos como deportistas ocasionales, eran individuos que realizaban al menos una actividad

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

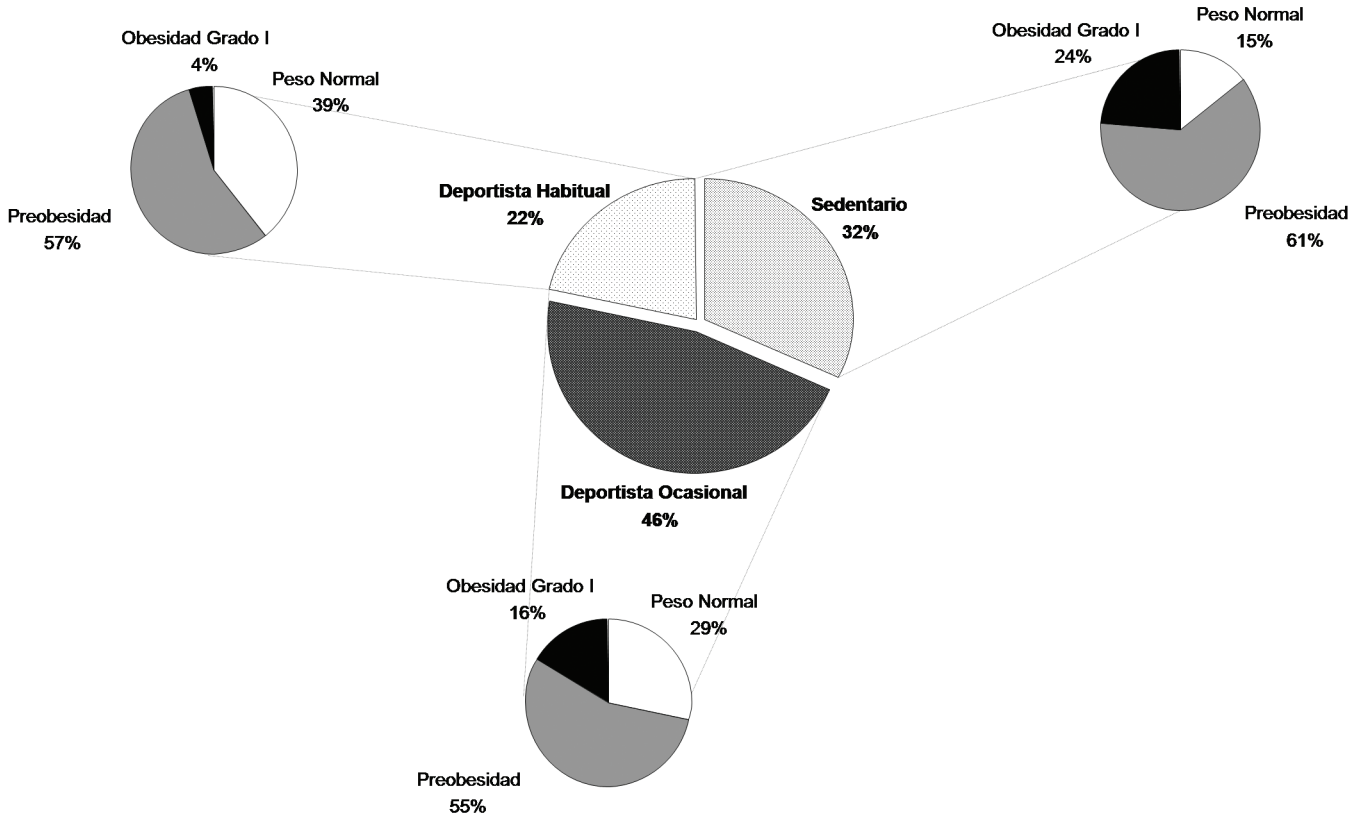


Figura 1. Distribución de varones en función de los hábitos de vida deportiva y el índice de masa corporal. En la figura se muestran los varones agrupados en función de los hábitos de vida deportiva (n=94) y en función de su índice de masa corporal (n=106).

física semanal con una duración mínima de una hora. Por último, los individuos definidos como deportistas, eran individuos que realizaban diariamente alguna actividad física con una duración mínima de una hora.

4.2. ÍNDICE DE MASA CORPORAL

El índice de masa corporal (IMC) de los pacientes se calculó a partir de los datos de peso y altura y fueron agrupados de acuerdo con los criterios de la OMS. Los pacientes fueron agrupados como individuos con peso normal (18,5-24,99), pre-obesos (25-29,99) e individuos con obesidad de grado I (30-34,99).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas Excell de Microsoft Office y SPSS-15 (SPSS. Inc., Chicago, IL). Para las diferentes variables se calculó el promedio y las desviaciones estándar. Para comparar dos variables con distribución normal, se empleó el test T de Student. Para comparar tres grupos, se empleó el test de Kruskal-Wallis con el programa SPSS. Se consideró que las diferencias eran significativas cuando el valor *p* fue menor o igual a 0,05.

RESULTADOS

DISTRIBUCIÓN DE VARONES EN FUNCIÓN DE LOS HÁBITOS DE VIDA DEPORTIVA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL.

En este trabajo se ha realizado el diagnóstico seminal en un grupo de varones que acuden con sus parejas a una clínica de reproducción asistida para someterse a un tratamiento de fertilidad (n=106). Junto con el consentimiento informado para participar en el estudio, se les hizo entrega a los pacientes de un cuestionario para conocer el peso, la talla y los hábitos de vida deportiva del individuo. En este cuestionario se incluyeron además los hábitos de consumo de alcohol, los hábitos de tabaquismo, el contacto con productos químicos y herbicidas, el tipo de dieta y la edad.

En este trabajo se muestra el resultado obtenido de los diagnósticos realizados en los varones agrupados en función de los hábitos de vida deportiva y en función de su índice de masa corporal (IMC). Los varones se diagnosticaron siguiendo los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicados en 2010.

La primera clasificación de los varones se realizó en función de sus hábitos de vida deportiva (Figura 1).

Se agruparon como sedentarios a aquellos varones que semanalmente no realizaban ninguna actividad física. Se definieron como ocasionales a aquellos individuos con una actividad física moderada y que realizaban alguna actividad física al mes. Por último, se consideraron deportistas habituales a aquellos individuos que realizaban alguna actividad física diaria. Los resultados demostraron que el 32% de los varones que acudieron a nuestra

A

	Deportista habitual	Deportista ocasional	Sedentario
n (número de individuos)	19	44	31
Edad (años)	37,4 ± 4,7	36,2 ± 4,8	37,6 ± 5,0
Peso (Kg)	81 ± 10	82,5 ± 8,3	85,1 ± 11,7
Talla (m)	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Abstinencia (días)	4,4 ± 1	4,7 ± 1,8	5,4 ± 5,1
Volumen eyaculado (ml)	5,2 ± 2,9	*3,8 ± 1,9	*3,8 ± 1,7
Espermatozoides (millones/ml)	54,9 ± 42,4	*48,9 ± 36,7	*41,1 ± 30,1
Movilidad (A+B)	49 ± 16,4	*39,7 ± 20,7	*39,9 ± 20,4
REM (millones/ml)	22,4 ± 29,3	29,4 ± 34,2	19 ± 20,4
Morfología (espermatozoides normales)	14,8 ± 6,6	17,8 ± 13	16 ± 5,3

B

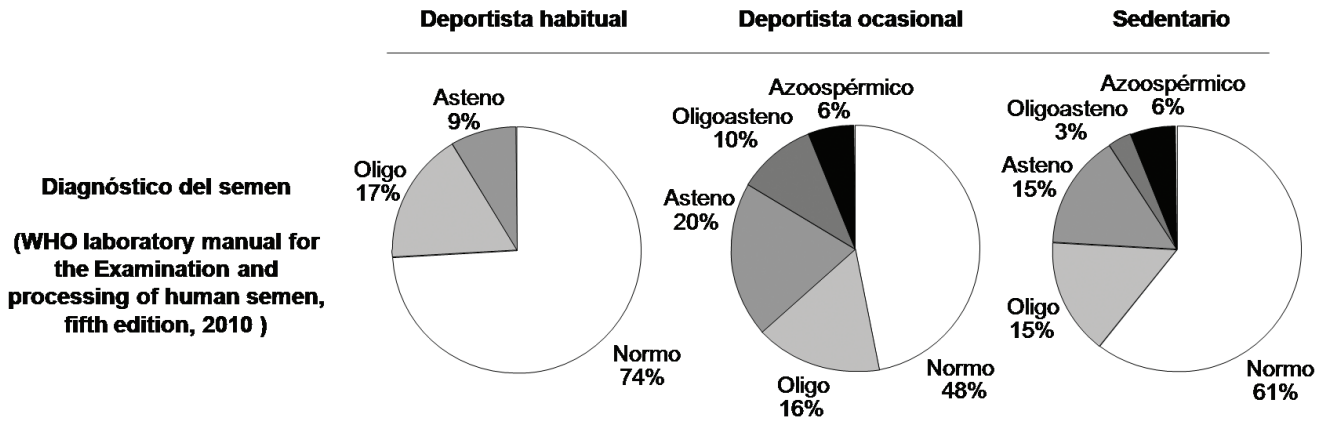


Figura 2. Relación entre actividad física y calidad espermática: distribución de varones según diagnóstico. En la figura se muestra el efecto de la actividad deportiva sobre la calidad espermática de los pacientes estableciendo tres grupos: deportistas habituales (n=19), deportistas ocasionales (n=44) y sedentarios (n=31). A) Tabla con los parámetros de calidad espermática * P-Value ≤ 0,05. B) Diagnóstico de donantes en función de los actuales valores de referencia de la OMS.

clínica de reproducción asistida llevan un tipo de vida sedentaria. Por el contrario, casi la mitad (46%) eran individuos que realizaban alguna actividad física a la semana. Por último, sólo el 22% de los individuos realizaban alguna actividad física diaria (Figura 1).

Una vez analizada la distribución de los pacientes en función de los hábitos de vida deportiva, se procedió a determinar el IMC en cada uno de los grupos. Los resultados demostraron que el 86% de los individuos sedentarios son considerados preobesos o alcanzan el Grado I de obesidad. En el caso de los individuos con actividad física ocasional, la preobesidad y la obesidad de grado I disminuyó hasta el 71%. Finalmente, en el grupo con actividad física habitual, los pocentajes de individuos con preobesidad y obesidad de grado I se redujeron al 61% (Figura 1).

RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD FÍSICA Y CALIDAD ESPERMÁTICA: DISTRIBUCIÓN DE VARONES SEGÚN DIAGNÓSTICO

Para el estudio del efecto de la actividad deportiva sobre la calidad espermática de los pacientes, se establecieron tres grupos como se describió anteriormente: deportistas habituales (n=19), deportistas ocasionales (n=44) y sedentarios (n=31). Cada individuo

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

A

	Peso normal	Preobesidad	Obesidad grado I
n (número de individuos)	29	61	16
Edad (años)	35,7 ± 4,4	36,7 ± 4,7	38,1 ± 5
Peso (Kg)	75 ± 5,6	85 ± 6,6	98 ± 9,6
Talla (m)	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Abstinencia (días)	4,5 ± 1,9	3,6 ± 1,9	6,4 ± 7,4
Volumen eyaculado (ml)	4,6 ± 2,7	4,5 ± 1,9	4,3 ± 1,8
Espermatozoides (millones/ml)	51,5 ± 39,1	44,8 ± 35,6	38,1 ± 32,5
Movilidad (A+B)	45,6 ± 18,3	35 ± 19,8	46,6 ± 20,9
REM (millones/ml)	33,9 ± 40,5	*16,9 ± 15,7	*16,9 ± 39,5
Morfología (espermatozoides normales)	17,9 ± 10,3	15,2 ± 5,7	15,2 ± 18,3

B

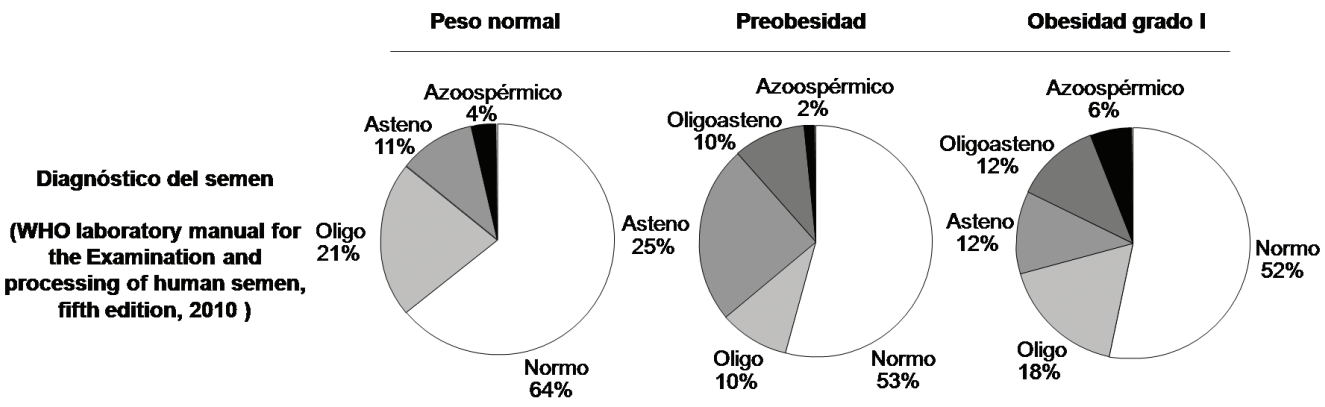


Figura 3. Relación entre índice de masa corporal y calidad espermática. En la figura se representa la relación entre el IMC y la calidad espermática de los pacientes. Se establecieron tres grupos según los criterios de la OMS: individuos de peso normal (n=29), individuos con preobesidad (n=61) e individuos con obesidad de grado I (16). A) Tabla con los parámetros de calidad espermática * P-Value ≤ 0,05. B) Diagnóstico de donantes en función de los actuales valores de referencia de la OMS.

fue diagnosticado en función de los actuales valores de referencia de la OMS.

En este trabajo comprobamos que los pacientes que acuden con sus parejas a nuestra clínica a someterse a un tratamiento de reproducción asistida presentan una mejora de sus parámetros seminales que estarían directamente asociados con los hábitos de vida deportiva de éstos. En la Figura 2A se observa que los deportistas habituales tienen aumentados el volumen de eyaculado, la concentración de espermatozoides y la movilidad espermática.

Por otro lado, se pudo observar un incremento en el porcentaje de pacientes normozoospérmicos asociado al incremento en los hábitos de vida deportiva. En el caso de los deportistas habituales, un 74% de los donantes eran diagnosticados como normozoospérmicos; sin embargo, este porcentaje disminuyó hasta el 48% y 61% en los deportistas ocasionales y sedentarios (Figura 2B). Es interesante reseñar que la actividad física no alteró el porcentaje de pacientes diagnosticados como oligozoospérmicos, sin embargo, el porcentaje de pacientes diagnosticados como oligoastenozoospérmicos, astenozoospérmicos y azoospérmicos estaba incrementado a medida que disminuía la actividad física de los pacientes (Figura 2B).

RELACIÓN ENTRE ÍNDICE DE MASA CORPORAL Y CALIDAD ESPERMÁTICA

Para determinar la posible relación entre el IMC y la calidad espermática de los pacientes, se establecieron tres grupos según los criterios de la OMS. Estos grupos fueron definidos como individuos de peso normal, individuos con preobesidad e individuos con obesidad de grado I.

En nuestro análisis, observamos una disminución de la concentración de espermatozoides a medida que aumenta el índice de masa corporal de los individuos (aunque este descenso no fue estadísticamente significativo). Además, es interesante indicar el descenso significativo del R.E.M. a medida que se incrementa el índice de masa corporal. Por un lado, los pacientes con peso normal presentaron un valor R.E.M. de 33,9±40,5 que fue menor en los pacientes preobesos (16,9±15,7) y en pacientes con obesidad de grado I (16,9±39,5) (Figura 3A).

Al igual que en el análisis en función de los hábitos deportivos, el análisis de los parámetros seminales en función del IMC se realizó siguiendo los valores de referencia de la OMS del año 2010. Los resultados mostraron que existe una clara disminución en el porcentaje de pacientes diagnosticados como normozoospérmicos a medida que aumenta el índice de masa corporal. Por un lado, el 64% de los pacientes de peso normal fueron diagnosticados como normozoospérmicos, mientras que, el 53% y el 52% de los pacientes preobesos o con obesidad de Grado I fueron diagnosticados como normozoospérmicos (Figura 3B).

DISCUSIÓN

En junio de 2010 la OMS definió los nuevos valores de referencia espermática, siendo actualmente el valor de referencia espermática 15 millones/c.c. (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, fifth edition, 2010). Estos valores de referencia han ido disminuyendo de forma significativa en los últimos años; de hecho, en el año 1986 el número de espermatozoides considerado normal era de 60 millones/c.c, en 1992 este valor era 20 millones/c.c. y ha ido disminuyendo paulatinamente hasta los valores actuales. No existe un solo agente responsable de la infertilidad masculina, por el contrario, son múltiples los parámetros que podrían ser los responsables del descenso en la calidad seminal. El estilo de vida, las condiciones medioambientales, el área geográfica o la situación socioeconómica del individuo son determinantes en la creciente infertilidad del hombre.

El objetivo de este trabajo ha sido relacionar los hábitos de práctica deportiva y el índice de masa corporal con la calidad espermática de individuos que acuden a nuestra clínica para someterse con sus parejas a un tratamiento de reproducción asistida. Es importante indicar, que en este trabajo la población de estudio y muestreo se limita a un grupo de individuos muy concreto con residencia habitual en la Comunidad de Extremadura; por ello, los resultados de este estudio no pueden ser extrapolados hacia una población general.

En el grupo de individuos que han participado en este estudio hemos observado en primer lugar una clara coincidencia entre los hábitos de vida deportiva y el índice de masa corporal. Como era de esperar, la mayoría de los individuos que practican algún deporte de manera habitual presentan índices de masa corporal normales. En estos individuos, (tanto deportistas habituales como donantes con índice de masa corporal normal) hemos observado unos mejores parámetros de la calidad espermática, así como un mayor porcentaje de individuos normozoospérmicos. Es importante indicar que generalmente estos individuos, aparte de realizar alguna actividad física, también practican otros hábitos de vida saludable, como no fumar, no abusar de bebidas alcohólicas y mantener una dieta equilibrada (datos no mostrados) Está descrito que el consumo habitual de tabaco y alcohol, el sedentarismo (Bonde and Storgaard, 2002; Stoy et al., 2004; Gebreegziabher et al., 2004; Magnusdottir et al., 2005), el entorno medioambiental (Tas et al., 1996; Giwercman and Bonde, 1998; Sharpe, 2000; Safe, 2005; Lopez-Teijon et al., 2008) y la mala alimentación (Vujkovic et al., 2009), pueden también afectar a la calidad espermática. Por ello, en el estudio que estamos realizando en la actualidad, van a ser incluidos otros hábitos de vida con el objetivo de determinar su importancia relativa en el descenso de la calidad espermática.

En la primera parte de este trabajo, se ha estudiado la posible correlación entre los hábitos de vida deportiva y los diferentes parámetros de calidad espermática. Aunque el deporte es un hábito saludable aconsejado por los médicos, el ejercicio constante y a elevados niveles puede provocar el descenso de la testosterona (Di et al., 2002) lo que induce la supresión endógena de la GnRh (Safarinejad et al., 2009). Puesto que la secreción de GnRh modula la secreción de la FSH y LH, el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal se ve alterado y, por consiguiente, el proceso de espermatogénesis (Safarinejad et al., 2009). Otro efecto del ejercicio de alto nivel es el estrés oxidativo que provoca un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (Tremellen, 2008; De Iuliis et al., 2009). Según algunos autores, el mecanismo antioxidante del semen en algunos casos no es capaz de equilibrar el exceso de especies reactivas de oxígeno provocado por un elevado estrés oxidativo (Manna et al., 2004; Tremellen, 2008; Amaral and Ramalho-Santos, 2009).

En nuestro estudio, los resultados indican que existe una mejora de los parámetros seminales en pacientes con una actividad física habitual. Sin embargo, es importante reseñar que los pacientes de los cuales hemos obtenido la muestra no son deportistas profesionales o de alto nivel. Por tanto, aunque está demostrado que una actividad física intensa y constante tiene efectos negativos sobre la capacidad fecundante del espermatozoide, unos hábitos de actividad física moderada y frecuente repercutiría de forma positiva en la calidad seminal.

En la segunda parte de nuestro trabajo, se ha tratado de relacionar el índice de masa corporal con la calidad espermática de los individuos. Está demostrado que un índice de masa corporal elevado (30 - 34,99), contribuye directa o indirectamente a la alteración del proceso de espermatogénesis (Kort et al., 2006). Del mismo modo, la obesidad también se ha relacionado con la disminución de los niveles de testosterona, afectando así a la fertilidad (Kort et al., 2006, Nguyen et al., 2007, Cabler et al., 2010). En individuos con alto grado de obesidad se produce además una acumulación de grasa en zonas próximas a los testículos que pueden producir un aumento de la temperatura reduciendo la calidad seminal (Cabler et al., 2010). Por último, los individuos obesos suelen tener dietas pobres en elementos esenciales como el Zinc (Koca et al., 2003) y un bajo consumo de ácido fólico que está relacionado con defectos en la espermatogénesis y el aumento del estrés oxidativo y la apoptosis (Vujkovic et al., 2009).

En nuestro estudio hemos observado cómo el porcentaje de individuos normozoospérmicos se reduce a medida que incrementa el índice de masa corporal de éstos. Además, nuestros resultados coinciden con otros estudios que correlacionan el parámetro de la concentración de espermatozoides con el índice de masa corporal (Nguyen et al., 2007, Vujkovic et al., 2009). Por tanto, en nuestro estudio podemos concluir que un índice de masa corporal normal, habitualmente asociado a una alimentación equilibrada se correlacionaría con un potencial fértil óptimo.

En definitiva, en este trabajo se demuestra la relación entre hábitos de vida deportiva e índice de masa corporal con la calidad espermática. Consideramos que estos factores deberían de ser tenidos en cuenta a la hora de realizar un proceso de selección más estricto de los donantes de esperma. Además, debería de recomendarse unos hábitos de vida deportivos así como la pérdida de peso en los pacientes que acuden a las clínicas con el deseo de tener descendencia. Finalmente es importante, indicar que son múltiples los factores que determinan la disminución de la fertilidad en las últimas décadas y sólo el estudio de todos ellos en su conjunto puede darnos una explicación del aumento de la infertilidad masculina en los países desarrollados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas PDT08A015, GRU08077, GRU09156 (INPATT) de la Junta de Extremadura, cofinanciado por European Regional Development Fund (FEDER) y Ayudas a los Grupos de Investigación de la Universidad de Extremadura PPGRU08J2. Agradecimiento especial al investigador J. Mijares del CCMIJU por la lectura y revisión crítica de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, S., and J. Ramalho-Santos. Aging, mitochondria and male reproductive function. Curr.Aging Sci 2009; 2:165-173.

Bonde, J. P., and L. Storgaard. How work-place conditions, environmental toxicants and lifestyle affect male reproductive function. Int.J.Androl. 2002; 25:262-268.

Cabler, S., A. Agarwal, M. Flint, and S. S. Du Plessis. Obesity: modern man's fertility nemesis. Asian J.Androl 2010; 12:480-489.

Calogero, A., R. Polosa, A. Perdichizzi, F. Guarino, V. S. La, A. Scarfia, E. Fratantonio, R. Condorelli, O. Bonanno, N. Barone, N. Burrello, R. D'Agata, and E. Vicari. Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. Reprod.Biomed.Online. 2009; 19:564-571.

De Iuliis, G. N., R. J. Newey, B. V. King, and R. J. Aitken. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. PLoS. One. 2009; 4:e6446.

Delbes, G., B. F. Hales, and B. Robaire. Toxicants and human sperm chromatin integrity. Mol.Hum.Reprod. 2010; 16:14-22.

Di, L. L., L. Guidetti, C. Baldari, A. Fabbri, C. Moretti, and F. Romanelli. Physical stress and qualitative gonadotropin secretion: LH biological activity at rest and after exercise in trained and untrained men. Int.J.Sports Med. 2002; 23:307-312.

Gaur, D. S., M. S. Talekar, and V. P. Pathak. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. Indian J.Pathol.Microbiol. 2010; 53:35-40.

Gebreegziabher, Y., E. Marcos, W. McKinon, and G. Rogers. Sperm characteristics of endurance trained cyclists. Int.J.Sports Med. 2004; 25:247-251.

Giwercman, A., and J. P. Bonde. Declining male fertility and environmental factors. Endocrinol.Metab Clin.North Am. 1998; 27:807-30, viii.

Hjollund, N. H., J. P. Bonde, T. K. Jensen, and J. Olsen. Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. Int.J.Androl. 2000; 23:309-318.

Ivorra, J. A., V. P. Garcia, R. M. Gasset, J. S. Garcia, A. F. Diaz, and J. A. Zamora. Relationship between male age and semen quality. Experience at the number 14 health-care area of the Valencia health-care agency. Arch.Esp.Urol. 2008; 61:705-710.

Jensen, T. K., S. H. Swan, N. E. Skakkebaek, S. Rasmussen, and N. Jorgensen. Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. Am.J.Epidemiol. 2010; 171:883-891.

Koca, Y., O. L. Ozdal, M. Celik, S. Unal, and N. Balaban. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. Arch.Androl. 2003; 49:355-359.

Kort, H. I., J. B. Massey, C. W. Elsner, D. Mitchell-Leef, D. B. Shapiro, M. A. Witt, and W. E. Roudebush. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. J.Androl. 2006; 27:450-452.

Kruger, T. F., and K. Coetzee. The role of sperm morphology in assisted reproduction. Hum.Reprod.Update. 1999; 5:172-178.

Kunzle, R., M. D. Mueller, W. Hanggi, M. H. Birkhauser, H. Drescher, and N. A. Bersinger. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. Fertil. Steril. 2003; 79:287-291.

Lopez-Teijon, M., M. Elbaile, and J. G. Alvarez.. Geographical differences in semen quality in a population of young healthy volunteers from the different regions of Spain. Andrologia. 2008; 40:318-328.

Magnusdottir, E. V., T. Thorsteinsson, S. Thorsteinsdottir, M. Heimisdottir, and K. Olafsdottir. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. Hum.Reprod. 2005; 20:208-215.

Manna, I., K. Jana, and P. K. Samanta. Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. Indian J.Exp.Biol. 2004; 42:816-822.

Menkveld, R., and T. F. Kruger.. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. Int.J.Androl. 1995; 18 Suppl 2:36-42.:36-42.

Nguyen, R. H., A. J. Wilcox, R. Skjaerven, and D. D. Baird. Men's body mass index and infertility. Hum.Reprod. 2007; 22:2488-2493.

Pichini, S., P. Zuccaro, and R. Pacifici. Drugs in semen. Clin.Pharmacokinet. 1994; 26:356-373.

Robbins, W. A., D. A. Elashoff, L. Xun, J. Jia, N. Li, G. Wu, and F. Wei.. Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. Cytogenet. Genome Res. 2005; 111:371-377.

Safarinejad, M. R., K. Azma, and A. A. Kolahi. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. J.Endocrinol. 2009; 200:259-271.

Safe, S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. Trends Endocrinol. Metab. 2005; 16:139-144.

Sartorius, G. A., and E. Nieschlag. Paternal age and reproduction. Hum.Reprod.Update. 2010; 16:65-79.

Sharpe, R. M. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. Br.Med. Bull. 2000; 56:630-642.

Stoy, J., N. H. Hjollund, J. T. Mortensen, H. Burr, and J. P. Bonde. Semen quality and sedentary work position. Int.J.Androl. 2004; 27:5-11.

Tas, S., R. Lauwerys, and D. Lison. Occupational hazards for the male reproductive system. Crit Rev.Toxicol. 1996; 26:261-307.

Tremellen, K.. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum. Reprod.Update. 2008; 14:243-258.

Vaamonde, D., M. E. Da Silva-Grigoletto, J. M. Garcia-Manso, R. Vaamonde-Lemos, R. J. Swanson, and S. C. Oehninger. Response of semen parameters to three training modalities. Fertil Steril 2009; 92:1941-1946.

Vujkovic, M., J. H. de Vries, G. R. Dohle, G. J. Bonsel, J. Lindemans, N. S. Macklon, P. J. van der Spek, E. A. Steegers, and R. P. Steegers-Theunissen. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. Hum. Reprod. 2009; 24:1304-1312.

DGP para todos los cromosomas*

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

*sin coste añadido

Nuevo servicio!!!

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA EL SCREENING DE DONANTES:

Fibrosis quística

(50 mutaciones* + polimorfismo TN)

Estudio de X-Frágil

www.pgdcem.com

centro de medicina embrionaria
www.pgdcem.co
Madrid y Barcelona -

&

Reproductive Genetic Institute
Chicago - USA

pgd@pgdcem.com

IMPACTO DE LAS ANOMALÍAS DEL ESPACIO PERIVITELINO DE LOS OVOCITOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y LA TASA DE IMPLANTACIÓN

IMPACT OF OOCYTE PERIVITELLINE SPACE SIZE IN THE EMBRYO DEVELOPMENT AND IMPLANTATION RATE

Marta Herrero[1,2], Pere Feliu[1], Celia Vives[1], Gerard Albaigès[1], Mònica Ballesteros[1], Teresa Planella[1], Francesca Vidal[3], Imma Saumell[1]
[1]Embriogyn, Centre de Reproducció Assistida i Diagnòstic Prenantal, Tarragona.
[2]Alumna en prácticas .Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona
[3]Unitat de Biologia Cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.Barcelona
email: isaumell@embriogyn.com
Fecha recepción: 27 Marzo 2011 · Fecha aceptación: 26 Abril 2011

RESUMEN

La posible relación entre las alteraciones de la morfología ovocitaria con las tasas de fecundación y el posterior desarrollo de los embriones es una cuestión aún discutida y todavía surge más controversia cuando las anomalías hacen referencia específicamente a alteraciones extracitoplasmáticas.

El objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar la influencia de las alteraciones extracitoplasmáticas de los ovocitos sobre la tasa de fecundación en procedimientos de FIV-ICSI, en su posterior desarrollo embrionario y la tasa de implantación.

Se han estudiado un total de 476 ovocitos en metafase II procedentes de 65 ciclos de ovodonación. Los ovocitos evaluados se han agrupado en función de la presencia (grupo de estudio GE) o no de alteraciones en el espacio perivitelino (grupo control GC).

En nuestro estudio se ha observado que el 20,17% de los ovocitos analizados presentaban alteraciones en el espacio perivitelino. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos analizados para ninguno de los parámetros estudiados: tasa de fecundación, calidad embrionaria, tasa de compactación a d+4, tasa de blastocisto a d+ 5 y tasa de implantación.

A partir de nuestros resultados, podemos concluir que las anomalías en el espacio perivitelino no influyen en el resultado de la fecundación mediante ICSI, tampoco en el posterior desarrollo embrionario *in vitro*, ni en su capacidad de implantación. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):34-37.

Palabras clave: Morfología ovocitaria, espacio perivitelino, calidad embrionaria, tasa de fecundación

SUMMARY

The possible relationship between alterations of oocyte morphology, fertilization rate and subsequent embryo development is an issue still under debate and even more controversial when extracitoplasmatic alterations are the focus of the discussion.

The aim of this study was to evaluate the influence of oocyte extracitoplasmatic alterations in the rate of fertilization (ICSI) and the subsequent in vitro embryo development and implantation rate.

We have evaluated a total of 476 metaphase II oocyte from 65 cycles of oocyte donation. Oocytes have been grouped according to the presence (study group GE) or absence of alterations in the perivitelline space (control group GC).

Anomalies in perivitelline space have been observed in 20.17% of the oocytes evaluated. No significant differences were found between the two groups of study for any of the parameters analyzed: fertilization rate, embryo quality, compaction rate, blastocyst rate at day + 5 and implantation rate. From our results, it can be concluded that an increased perivitelline space does not affect ICSI fertilization outcome or subsequent in vitro embryo development. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):34-37.

Key words: oocyte morphology, perivitelline space, embryo quality, fertilization rate.

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de Fecundación *in vitro* (FIV) la evaluación de la morfología ovocitaria se realiza en el caso de la ICSI. Los parámetros más frecuentemente estudiados de la morfología ovocitaria son: alteraciones citoplasmáticas (granulosidad en el centro del ovocito, agregación del retículo endoplasmático liso, vacuolas e inclusiones citoplasmáticas), y alteraciones extracitoplasmáticas (exudados en el espacio perivitelino, espacio perivitelino incrementado, alteraciones del primer corpúsculo polar y anomalías de la zona pelúcida) (Ardoy et al., 2008).

La medida en que la morfología de los ovocitos está relacionada con la calidad

y la funcionalidad de éstos suscita una controversia que se mantiene vigente a día de hoy. Varios estudios realizados sobre esta temática aportan conclusiones divergentes y sostienen posturas enfrentadas (Rienzi et al., 2011). Algunos autores sostienen la idea de que las alteraciones citoplasmáticas y extracitoplasmáticas del ovocito juegan un papel determinante en la fecundación y en el posterior desarrollo embrionario (Xia, 1997; Rienzi et al., 2008). En este sentido, trabajos concretos reflejan la influencia de las alteraciones extracitoplasmáticas en detrimento de la calidad embrionaria después de la ICSI (Suppinyopong et al., 2000; Lasiene et al., 2009), contrariamente a aquellos que asocian un mayor tamaño del espacio perivitelino a una mejor calidad embrionaria (Ten et al., 2007). Otros destacan que el espacio perivitelino incrementado reduce la tasa de fecundación o puede disminuir el potencial de implantación de los embriones obtenidos (Serhal et al., 1997). En contraposición a estos resultados, otros estudios no demuestran ninguna correlación entre la morfología ovocitaria, las tasas de fecundación y el desarrollo embrionario (Sutter et al., 1996; Balaban et al., 1998; Chamayou et al., 2006).

El presente estudio tiene como objetivo analizar específicamente si las alteraciones extracitoplasmáticas del ovocito, en concreto el incremento del espacio perivitelino y la presencia de exudado, tienen repercusión en la fecundación, el posterior desarrollo embrionario y el potencial de implantación de los embriones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado 476 ovocitos maduros destinados a FIV-ICSI de 65 ciclos de ovodonación realizados en nuestro centro. Los ovocitos estudiados proceden expresamente de donantes, para descartar posibles efectos de los factores de esterilidad femenina sobre la morfología ovocitaria.

Las donantes (edad 18-35 años) han sido tratadas siguiendo una pauta de estimulación con gonadotropinas recombinantes y urinarias, y antagonistas de la GNRH, establecida por nuestro centro. Al tercer día después de la regla se inició la administración de FSHr (225,4 +/- 63,1 UI). El 94,5% recibieron LH durante la estimulación. La administración del antagonista se realizó en base al tamaño folicular (13-15 mm de diámetro máximo), y en régimen de administración diaria. La señal de la ovulación se indicó en d+10,7 habitualmente con 0,2 mg de triptolerina, más una ampolla de 2500 Ul de hCG, administradas vía subcutánea 36 horas antes de la punción folicular.

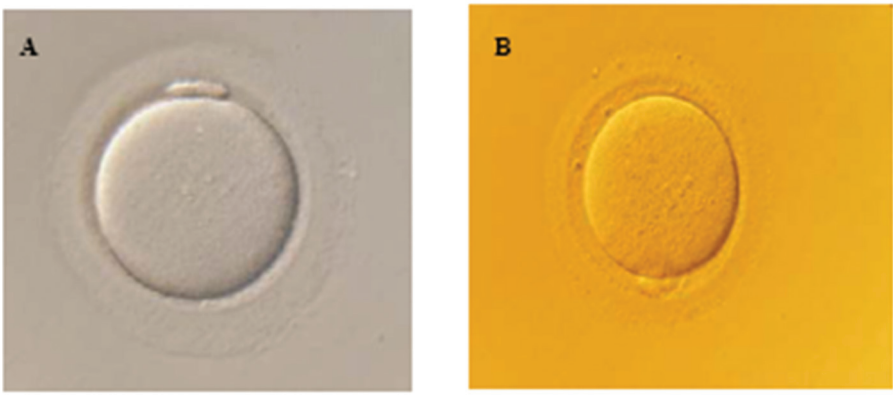


Figura 1: (A) Ovocito grupo control. (B) Ovocito con anomalías en el espacio perivitelino.

Se han incluido en el estudio los ovocitos destinados a ICSI, independientemente de que en el mismo ciclo haya otros ovocitos que se destinen a FIV convencional.

La decumulación de los ovocitos se ha realizado mediante un proceso combinado, enzimático (hialuronidasa) y mecánico (a través de pipetas de 140 y 170 µm de diámetro; Cook®).

Una vez realizada la decumulación y previamente a la ICSI se evaluó la morfología de los ovocitos en Metafase II. La valoración se llevó a cabo con aumentos de 40x a través de un microscopio de modulación de contraste de Hoffman (IX51 Olympus®).

Los ovocitos fueron clasificados en función de la presencia (GE, grupo de estudio) o ausencia (GC, grupo control) de alteraciones en el espacio perivitelino. (Figura 1)

Los ovocitos microinyectados y los embriones obtenidos se mantuvieron en cultivo en microgotas de 40µl (G1+, Vitrolife serie 5+®), permitiendo el seguimiento individualizado de cada uno de ellos, evaluándose la tasa de fecundación y la calidad embrionaria. En los ciclos en los que se realizó un cultivo largo (G2+, Vitrolife serie 5+®) también se analizó la tasa de compactación a d+4 y la tasa de formación de blastocisto a d+5.

La transferencia embrionaria se realizó en día +3 o en día +5, según el número de embriones de buena calidad y cada caso en particular. La transferencia se llevó a cabo mediante catéter de transferencia Wallace® con seguimiento por ecografía, según el protocolo de transferencia del centro.

La tasa de implantación se calculó sólo teniendo en cuenta aquellos ciclos en los que se realizó la transferencia en día +3, incluyendo aquellos que se habían transferido embriones procedentes del mismo grupo de ovocitos (GE o GC) y que mediante ecografía se pudo confirmar la implantación de un 100% o 0%.

En conjunto, los parámetros evaluados en el estudio fueron: la incidencia de alteraciones en el espacio perivitelino, la tasa de fecundación, la tasa de embriones de buena calidad (transferidos y vitrificados), la tasa de compactación, la tasa de formación de blastocisto y, por último, la tasa de implantación de aquellos ciclos en los que la transferencia se realizó a d+3.

El análisis estadístico utilizado para establecer las comparaciones entre los resultados obtenidos respecto a los dos los grupos (GE, GC) fue la comparación de proporciones (Prueba Z) con un nivel de significación p=0,05.

RESULTADOS

En los 65 ciclos realizados se analizaron un total de 476 ovocitos en Metafase II y un 20,17% (96/476) presentaron alteraciones en el espacio perivitelino.

La tasa de fecundación en los ovocitos con un espacio perivitelino anómalo (GE) fue del 83,33% y en los ovocitos normales (GC) de un 81,32%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en las tasas de fecundación entre los dos grupos de ovocitos (z = 0,46; p = 0,652). (Figura 2).

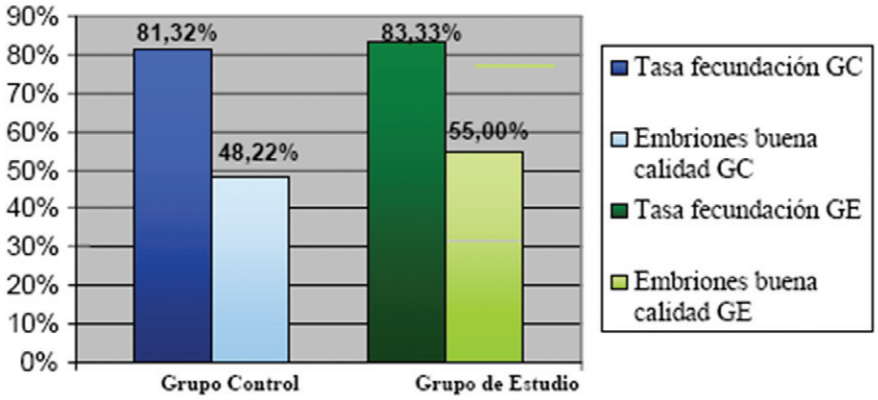


Figura 2: Comparativa porcentual de la tasa de fecundación y del porcentaje de embriones de buena calidad obtenidos.

Se contabilizaron como embriones de buena calidad aquellos que por su buena morfología fueron transferidos o congelados (vitrificados). No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) entre los embriones de buena calidad obtenidos a partir de ovocitos con espacio perivitelino alterado respecto al de los procedentes de ovocitos normales (55,0% en GE vs 48,2% en GC; z=1,12; p=0,250). (Figura 2).

Se mantuvieron en cultivo largo hasta día +5 un total de 86 embriones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) entre los dos grupos de embriones en cuanto a tasa de compactación a d+4. De los embriones del grupo de estudio un 62,42% compactaron correctamente mientras que del grupo control compactaron un 68,42% (z = -0,55; p = 0,582). Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) entre los dos grupos de embriones que fueron capaces de formar blastocistos a d+5. La tasa de formación de blastocisto fue de 41,38% en el grupo de estudio y 54,39% en el grupo control (z = -1,14; p = 0,250). (Figura 3).

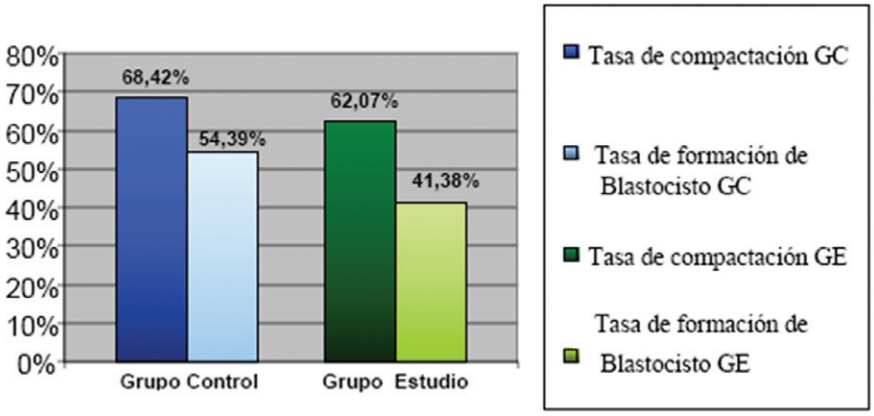


Figura 3: Comparativa porcentual de la tasa de compactación y de la tasa de formación de blastocitos.

Los resultados obtenidos en cuanto a tasas de implantación tampoco mostraron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados (50% en GE vs 37,04% en GC) (z = 0,23; p = 0,401). (Figura 4).

DISCUSIÓN

Tal y como queda reflejado en los Criterios ASEBIR, (Ardoy et al., 2008) existe disparidad respecto a las características de la morfología ovocitaria cuya influencia sea relevante en relación a los criterios de selección embrionaria. No obstante, la valoración previa a la ICSI de parámetros ovocitarios de fácil evaluación y la recopilación de los resultados obtenidos en los ciclos realizados, ofrecen datos de interés que podrían ser usados como marcadores de calidad o viabilidad embrionaria y capacidad de implantación. (Balaban et al., 1998).

El tamaño del espacio perivitelino, así como la presencia de exudado, son características fácilmente valorables, y en este trabajo nos propusimos determinar su relación con diferentes variables de calidad embrionaria e implantación.

El estudio se ha realizado exclusivamente en ovocitos de donante para minimizar un posible efecto de la infertilidad femenina sobre los ovocitos. No obstante, nos sorprende la incidencia observada de alteraciones extracitoplasmáticas (20,17%). Este hecho, podría hacer pensar que estas alteraciones sean consideradas como variables de la normalidad y deberse a factores intrínsecos de los ovocitos (Balaban et al., 1998). De todas formas, no hay que olvidar que estos ovocitos se encuentran *in vitro* y habría que considerar si factores extrínsecos como la estimulación ovárica, la aspiración folicular, el cultivo y manipulación *in vitro* o la decumulación, pueden afectar estos parámetros (Balaban et al., 1998). Para profundizar en el posible efecto de la estimulación ovárica, sería interesante poder ampliar estos estudios relacionando la presencia de alteraciones extracitoplasmáticas según la media de ovocitos obtenidos por ciclo y la concentración de estradiol el día de la hCG, pudiendo así establecer una relación entre la presencia de alteraciones y la respuesta a la estimulación ovárica.

Algunos autores, con modelos animales (Suppinyopong et al., 2000; Talbot and Dandekar, 2003), postulan que el tamaño del espacio perivitelino puede afectar al mecanismo de aproximación

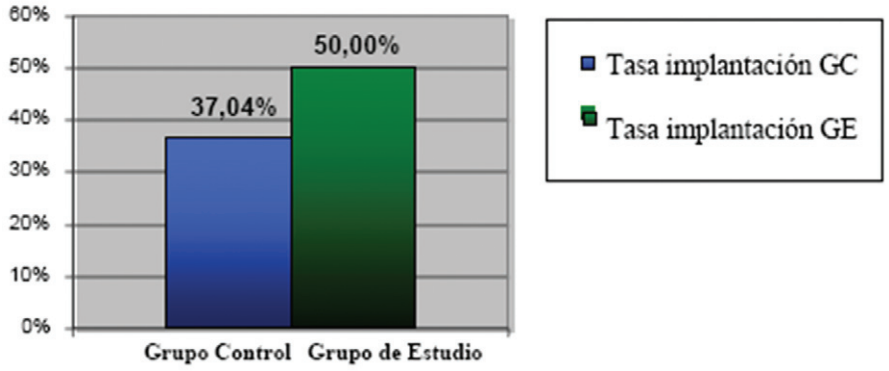


Figura 4: Comparativa porcentual entre ovocitos EP afectados y no afectados en cuanto a tasa de implantación.

del espermatozoide a la membrana del ovocito, influyendo en la fusión de las membranas y en la tasa de fecundación. En nuestro estudio, las tasas de fecundación obtenidas son similares para ambos grupos de ovocitos (GE y GC), aunque por la naturaleza de la ICSI no podemos valorar la posible interferencia de las anomalías del espacio perivitelino sobre el proceso de fusión de membranas.

De esta forma, debemos ser conscientes de que la conclusión de este estudio sólo es aplicable a los ovocitos que han sido microinyectados, ya que en el estudio no se contabilizan los ovocitos de FIV convencional y por tanto no podemos asegurar que éstos tengan el mismo comportamiento.

Asimismo, los resultados indican que las anomalías observadas en el espacio perivitelino no afectan negativamente a la compactación de los embriones, ni tampoco a la formación del blastocisto. Por tanto, el establecimiento de los sistemas de adhesión celular y comunicación intercelular, necesarios para la formación de la mórula, no parecen verse afectados por el tamaño del espacio perivitelino. Dicho tamaño puede condicionar indirectamente el establecimiento de contactos interblastoméricos según la teoría clásica de determinación y diferenciación celular. De la misma manera, a partir de los resultados de nuestro trabajo y de la tasa de obtención de blastocistos en los dos grupos, se evidencia que la polarización y la determinación de las estirpes celulares tampoco se ven influidas por las anomalías extracitoplasmáticas ovocitarias.

El diseño experimental de nuestro estudio presenta una limitación respecto a la valoración de las tasas de implantación, ya que si en una transferencia los embriones proceden de los dos grupos (GE y GC), no han podido ser contabilizados por no saber con certeza qué embrión es el que ha implantado (a no ser que obtengamos un 0 o 100% de implantación). Sería necesario ampliar la serie de estudio y realizar transferencias homogéneas para poder confirmar los resultados obtenidos. No obstante, los resultados preliminares derivados del estudio realizado indican que el proceso de contracción y dilatación del embrión necesario para la eclosión no se ve alterado por la presencia de anomalías en el espacio perivitelino.

En conclusión, los resultados derivados de nuestro estudio coinciden con los reportados previamente por diferentes autores (Sutter et al., 1996; Balaban et al., 1998) y confirman que no se observa correlación entre la morfología alterada del espacio perivitelino y la capacidad del ovocito para desarrollar embriones de buena calidad y con un buen potencial de implantación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardoy M, Calderon G, Cuadros J, Figueroa MJ, Herrer R, Moreno JM, et al. Cuadernos de Embriología Clínica.. II Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones temprano y blastocistos humanos. 2nda ed. Edita: Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR). 2008. p.9-16.

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998; 13:3431-3433.

Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos. Reprod Biomed Online. 2006; 13:661-667.

Lasiene K, Vitkus A, Valanciūte A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. Medicina (Kaunas). 2009;45:509-515.

Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. Fertil Steril. 2008; 90:1692-1700.

Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. Hum Reprod Update. 2011; 17:34-45.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1997; 12:1267-1270.

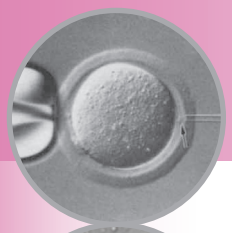
Suppinyopong S, Choavaratana R, Karavakul C. Correlation of oocyte morphology with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. J Med Assoc Thai. 2000; 83:(6)627-632.

Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1996; 11:595-597.

Talbot P, Dandekar P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? Microsc Res Tech. 2003;61(4):349-357.

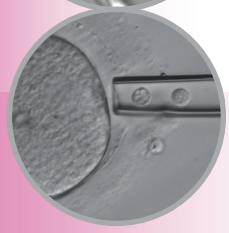
Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. Reprod Biomed Online 2007; 14:40–48.

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod. 1997; 12:1750-1755.



● ICSI

● IMSI



● Biopsia de cuerpo polar

Ahora también Incubadores NBS

Eppendorf® is a registered trademark. All rights reserved, including graphics and pictures.
Copyright © 2009 by Eppendorf AG

Competencia en reproducción asistida

Tanto para sus aplicaciones en ICSI, IMSI, diagnóstico genético preimplatacional o biopsia de cuerpo polar, ¡Eppendorf le ofrece un amplio rango de consumibles y equipamiento para su laboratorio de reproducción!

Tecnologías innovadoras combinadas con un funcionamiento sencillo para poder realizar complejas técnicas de micromanipulación de forma fácil, sencilla y fiable.

Incubadores de CO_2
- Capacidades de 170, 48 y 14 litros
- Sistemas por calentamiento directo
- Amplia gama de opciones

Micromanipuladores TransferMan NK2
- Sistema con joystick integrado con control proporcional para ajuste fino y grueso
- Almacenamiento de posiciones y tecla Home para cambio de capilares

Microinyectores CellTram
- Sistemas de émbolo libres de mantenimiento
- Ergonómicos, fáciles de usar y muy precisos

Para más información visite
www.eppendorf.es/celltech

eppendorf
In touch with life

New Brunswick
an eppendorf company

Eppendorf Ibérica S.L.U. · Avenida Tenerife 2 · Edificio 1 · Madrid · Spain · Tel: +34 91 651 76 94 · Fax: +34 91 651 81 44
E-mail: iberica@eppendorf.es . www.eppendorf.es
Application Support: Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: support@eppendorf.com

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

¿ES ÚTIL EL ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO PARA LA INDICACIÓN DE IAC COMO TRA?

IS THE SPERM DNA FRAGMENTATION TEST USEFUL TO THE IUI INDICATION AS ART?

María José Lázaro, Laura Vidal, Concepción Linares, Luz Rodríguez.
Laboratorio de Andrología, Unidad de Reproducción Humana, Servicio de Ginecología y Obstetricia, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.
e-mail: lrodriguezr@fjd.es
Fecha recepción: 30 Septiembre 2010 · Fecha aceptación: 31 Octubre 2010

RESUMEN

Objetivo: Valorar la utilidad de realizar el test de fragmentación de ADN espermático para indicar una IAC como técnica recomendada a una pareja infértil en la Unidad de Reproducción de la Fundación Jiménez Díaz.

Ubicación: Laboratorio de Andrología, Unidad de Reproducción, Servicio de Ginecología y Obstetricia, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Material: Kit de fragmentación de ADN espermático Halosperm de Halotech, tinción Diff-Quick, microscopio de campo claro.

Diseño: Durante el periodo comprendido entre abril y junio de 2010, se realizó el test de fragmentación de ADN espermático a las muestras de semen procedentes de aquellos pacientes que cumplían los siguientes criterios de inclusión: REM mayor o igual a 5 millones y edad del varón menor o igual a 45 años.

Conclusión: En este grupo de pacientes el estudio de los niveles de fragmentación de ADN espermático no aporta información adicional al estudio de semen para indicar la TRA que se realiza en nuestra unidad. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):39-41.

Palabras clave: ADN, fragmentación, muestra seminal, IAC

SUMMARY

Aim: To assess the usefulness of sperm DNA fragmentation test to indicate IUI to an infertile couple as recommended technique in the Reproduction Unit of Fundación Jiménez Díaz.

Location: Andrology Laboratory, Reproduction Unit, Gynaecology and Obstetrics, Fundación Jiménez Díaz, Madrid

Material: Kit Halosperm from Halotech for sperm DNA fragmentation, Diff-Quick staining, light microscope.

Design: Between April and June 2010, DNA fragmentation test was done in semen samples from patients who complied with the following inclusion criteria: REM greater or equal to 5 million, male younger or equal to 45 years old.

Conclusion: In this group of patients, the study of the levels of sperm DNA fragmentation does not provide additional information to the study of sperm for ART which is performed in our Unit. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1): 39-41.

Key words: ADN, fragmentation, sperm sample, IUI

INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial Conyugal (IAC) es la primera opción terapéutica en aquellas parejas infértiles que presentan, al menos, integridad anatómica de las trompas de Falopio, y un número de espermatozoides con movilidad progresiva tras la capacitación (REM) superior a $5x10^6$ Millones (WHO, 1999).

Se sabe que la integridad del ADN paterno es necesaria para la consecución de un embarazo a término (Evenson et al., 1999; Larson et al., 2000; Fernández et al., 2003), y que existe una correlación negativa entre dicha integridad y la fertilidad tanto in vivo como in vitro (Evenson et al., 1999; Saleh et al., 2002). Además, existe cierta controversia en cuanto a si hay alguna relación entre el porcentaje de fragmentación del ADN espermático y los parámetros seminales analizados rutinariamente como concentración y movilidad (Irvine et al., 2000; Cohen-Bacrie et al., 2009). Esta integridad del ADN espermático se puede estimar, entre otras técnicas, mediante el test SCD (*Sperm Chromatin Dispersion*), que consiste en producir una descondensación diferencial de la cromatina entre aquellos espermatozoides que presentan ADN fragmentado con respecto a aquellos que lo mantienen intacto.

Evenson et al. (2002), mediante la técnica SCSA, consideraron que valores del índice de fragmentación de ADN espermático entre 25-30% corresponden a un bajo potencial para la fecundación, y valores superiores al 30% corresponden a un potencial muy bajo (cercano a cero). Sergerie et al. (2005) propone un valor umbral del 20% con el ensayo TUNEL, y Fernández et al. (2005) de un 27% usando SCD. Bungum et al. (2007), publicó que

las parejas que realizan IAC tienen una mayor tasa de embarazo cuando el porcentaje de fragmentación es inferior del 30% con la técnica SCSA.

El estudio de semen para Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) que se realiza en la Fundación Jiménez Díaz incluye el análisis del volumen, la concentración, la movilidad y el REM. Éste nos permite evaluar si una muestra de semen es adecuada para realizar una IAC. El valor de REM mínimo recomendado por la OMS 1999 para indicar inseminación conyugal es de 5 millones de espermatozoides móviles. Debido a que en nuestro centro no se tiene en cuenta la integridad del ADN espermático para recomendar IAC como TRA, nos proponemos, como objetivo de este trabajo, valorar la utilidad de la inclusión del test de fragmentación de ADN en el estudio inicial del semen

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio, realizado en el laboratorio de Andrología de la Fundación Jiménez Díaz en el periodo comprendido entre abril y junio de 2010, fueron analizadas un total de 50 muestras seminales.

Criterios de inclusión: Varones cuya edad no supere los 45 años, que hayan obtenido la muestra de semen en la Fundación Jiménez Díaz y ésta haya sido completa, con un periodo de abstinencia inferior a 10 días y con un REM mayor de 5 millones. Muestras de semen y procesado: Las muestras fueron recogidas en una sala privada de la Fundación Jiménez Díaz, cercana al laboratorio de andrología, obtenidas por masturbación en frascos de plástico estériles, y procesadas para el estudio de fragmentación en un tiempo no superior a una hora tras la eyaculación.

El análisis inicial de las muestras fue realizado en base a los criterios de la OMS, evaluando volumen, concentración y movilidad de la misma.

La capacitación espermática, necesaria para el cálculo del REM de la muestra, se realizó mediante gradientes de densidad.

La fragmentación del ADN espermático fue estudiada utilizando el Kit Halosperm, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante; los portaobjetos con la muestra fijada fueron teñidos con Diff-Quick.

El contaje de espermatozoides en los portaobjetos teñidos fue realizado siempre por dos observadores, mediante un microscopio de campo claro a 400 aumentos, contando cada uno de ellos un mínimo de 300 espermatozoides, sin existir diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos observadores. Además, antes del comienzo del estudio, se realizaron 10 contajes de prueba, cuyos resultados fueron contrastados con los obtenidos en un laboratorio con más experiencia en esta técnica, sin que tampoco se observaran diferencias. El análisis estadístico se realizó aplicando el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney.

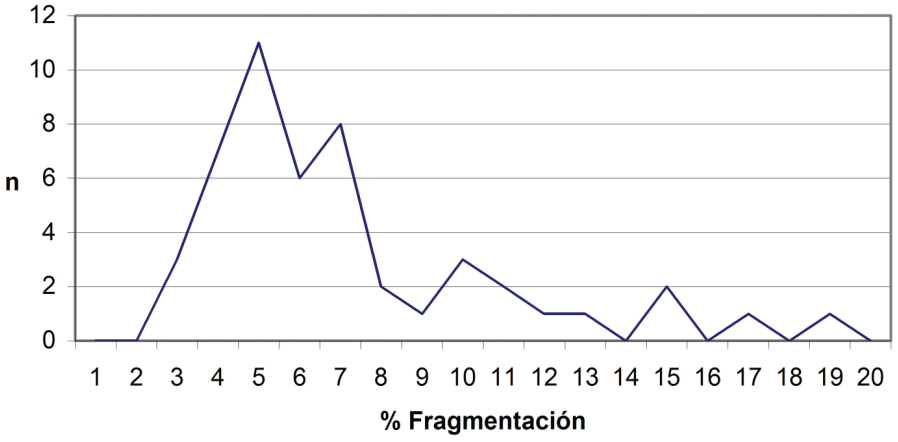


Figura 1. Distribución de las frecuencias de % de fragmentación redondeadas a la unidad

REM (Millones)	N	Media fragmentación (%)
5-10	11	9.50
10-15	13	6.35
15-20	15	7.57
20-25	5	4.56
25-30	4	4.27
>30	2	4.55

Tabla I: Relación entre el REM y el porcentaje de fragmentación

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los resultados del estudio, donde se observan los porcentajes de fragmentación de las 50 muestras. Se puede observar que todas las muestras presentan una fragmentación inferior al 20% (valor umbral de fragmentación más bajo en la bibliografía consultada), encontrándose 41 de las 50 muestras analizadas por debajo del 10%.

En la tabla I se muestran los resultados de fragmentación obtenidos relacionados con el REM. Parece existir una relación inversa entre la fragmentación del ADN espermático y el REM, pero, puesto que el tamaño muestral de los grupos es pequeño, no podemos aplicar ningún test estadístico.

Al relacionar el periodo de abstinencia y el porcentaje de fragmentación de la muestra seminal, se observa un incremento de la fragmentación del ADN cuando el periodo de abstinencia es superior a 5 días. Esta diferencia resulta estadísticamente significativa al aplicar el test no paramétrico de Mann-Whitney, con una p = 0,005 (Tabla II).

periodo de abstinencia (días)	N	Media fragmentación (%)
<5	43	6.16
6-10	7	12.06

Tabla II: Relación entre los días de abstinencia y el porcentaje de fragmentación (p = 0,005)

El tiempo medio hasta el inicio del procesamiento de la muestra de semen para el estudio de la fragmentación del ADN fue de 17 minutos, siendo el tiempo de espera más largo de 45 minutos. Se agruparon los resultados estableciendo como punto de corte 15 minutos. En la tabla III se muestra los resultados, observándose que la media de fragmentación es prácticamente igual.

TIEMPO HASTA INICIAR LA TÉCNICA (minutos)	N	Media fragmentación (%)
≤ 15	30	7.13
> 15	20	7.90

Tabla III: Relación entre el tiempo hasta inicio de la técnica y el porcentaje de fragmentación. (p = 0,58).

DISCUSIÓN

En nuestro estudio no se ha encontrado ninguna muestra con un porcentaje de fragmentación por encima de los umbrales de normalidad descritos en la bibliografía consultada (Evenson et al., 2002; Fernández et al., 2005; Sergerie et al., 2005; Bungum et al., 2007). Esto puede ser debido a que todos los eyaculados estudiados tenían un REM superior a 5 millones. Esto implica que, aunque tuvieran algún parámetro seminal alterado, todos tuvieron un recuento total elevado de espermatozoides móviles en el eyaculado. Según Cohen-Bacrie et al. (2009), este tipo de muestras presentan mayoritariamente un grado de fragmentación del 0 al 20%.

En nuestro estudio, al aumentar los días de abstinencia aumenta el porcentaje de fragmentación, lo que concuerda con lo observado por Thomson et al. (2009) y Cohen-Bacrie et al. (2009). El hecho de que el número de pacientes con más de 5 días de abstinencia sea bajo obliga a que esta conclusión sea considerada con reservas, teniendo en cuenta que otros autores como De Jonge et al. (2004) no han observado esta correlación. Según los criterios utilizados en la Fundación Jiménez Díaz, las muestras que constituyen nuestra población de estudio serían aptas para IAC. Al incluir los resultados de fragmentación espermática no se modificaría en ningún caso la indicación de IAC, lo que nos hace pensar que la inclusión sistemática del estudio de fragmentación del ADN espermático en este tipo de pacientes no resultaría útil. Sin embargo, debido a que el número de muestras analizado es bajo, sería conveniente aumentar el tamaño muestral para confirmar el resultado.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros agradecimientos a URH-García del Real, por su apoyo a la hora de poner en marcha la técnica de la fragmentación del ADN espermático en nuestro laboratorio y su colaboración en los controles de las pruebas de contaje iniciales.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez J. Aplicaciones clínicas del estudio de fragmentación del ADN espermático. Int J Androl 2007;5(4):354-363.

Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H *et al*. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003;18(5):1023-1028.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. Hum Reprod 2007;22(1):174-179.

Cohen-Bacrie P, Belloc S, Ménézo Y, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. Fertil Steril 2009;91(5):1801-1805.

De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. Fertil Steril 2004;82(1):57-65.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K *et al*. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod vol 1999;14(4):1039-1049.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl 2002;23(1):25-43.

Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vázquez R, Álvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 2003;24(1):59-66.

Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril 2005;84(4):833-842.

Irvine S, Twigg J, Gordon E, Fulton N, Milne P, Aitken J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. J Androl 2000;21(1):33-44.

Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum Reprod 2000;15(8):1717-1722.

Saleh R, Agarwal A, Nada E, El-Tonsy M, Evenson D, Larson K. Negative effects of sperm nuclear DNA damage on the fertility potential of couples with idiopathic and male-factor infertility. Fertil Steril 2002;78(1):S61

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. Hum Reprod 2005;20(12):3446-3451

Thomson LK, Fleming SD, Schulke L, Barone K, Zieschang J-A, Melton Clark A. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. Fertil Steril 2009;92(3):991-1001.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press 1999.

Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. J Assist Reprod Genet 2009; 26:41–46

Zini A, Sigman M. Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. J Androl 2009;30(3):219-229.

© Vitrolife 1.110408.1

Rapid-i™

Vitrification System

The world's first integrated closed vitrification system.
Your job just got a lot easier.

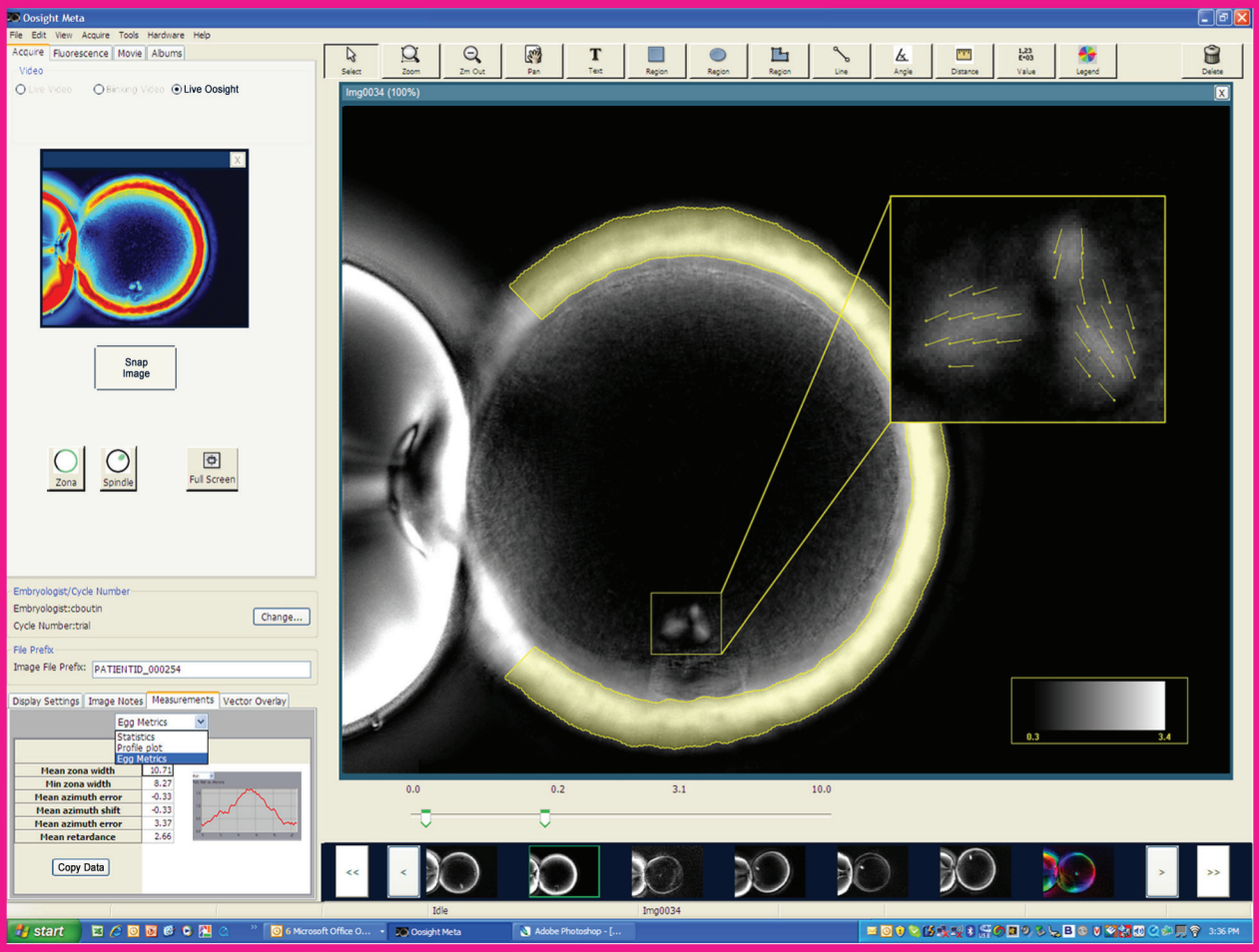
The Rapid-i™ Vitrification System was successfully launched at ESHRE 2010, and has since then been introduced all over the world. To learn more please contact your local representative.

EMBRYOTOOLS GRUPO

www.embiol.com

Vitrolife
Innovative Cell and Tissue Technology

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



EMIB GRUPO

www.embiol.com

CRI

INFORMACIÓN A PACIENTES EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN ENFERMEDADES DE APARICIÓN TARDÍA: ALGO A MEJORAR.

Rosales A, Clavero A, Gonzalvo MC, Carrillo S, Molina I, González B, Morales N, Palacios ER, Ortiz AP, Montero L, Castilla JA.
Laboratorio de Embriología y Andrología, Unidad de Reproducción, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La mayoría de los profesionales (clínicos, embriólogos, genetistas y especialistas en ética) están de acuerdo en ofrecer a familiares y pacientes con enfermedades de aparición tardía la opción del DGP. Este porcentaje alcanzaría hasta al 92% en nuestro medio (Fortuny et al., 2009). Sin embargo, según estos autores, el porcentaje de profesionales a favor de utilizar el Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) para seleccionar embriones libres de mutaciones de alta penetrancia para cáncer hereditario se reduce al 61%. Este menor porcentaje probablemente sea reflejo de las creencias personales de los profesionales, y viene a poner en evidencia la objetividad de los profesionales sanitarios a la hora de informar a sus pacientes.

Este elevado porcentaje de profesionales (61%) que aceptan esta técnica contrasta con la opinión de los pacientes con estos síndromes y sus familiares. En los primeros estudios publicados con tamaños muestrales pequeños, n=20 en el estudio de Kastrinos et al (2007) y n=52 en el de Menon et al. (2007), las tasas de aceptación del DGP en pacientes con enfermedades de aparición tardía eran elevadas, 90% y 75% respectivamente. No obstante, este panorama ha ido cambiando conforme han aparecido estudios de tamaños muestrales superiores, n=111 en el estudio de Quinn et al. (2008) y 216 en el estudio de Lammens et al. (2009), con porcentajes de aceptación del 57% y el 35%, respectivamente.

Pero lo que llama la atención es cuando se le pregunta a los pacientes y familiares si ellos se someterían a dicha técnica, resultando que sólo un 13 % (Staton et al., 2008) y 14% (Menon et al., 2007) lo utilizarían personalmente. Entre las razones por las cuales no lo utilizarían está la posibilidad de que el DGP tenga un efecto a largo plazo en los niños nacidos, la baja tasa de éxitos de la técnica y la posibilidad de diagnósticos erróneos (Lammens et al., 2009)

Creemos que estas discrepancias entre profesionales y pacientes, ponen en evidencia la necesidad de replantearnos las vías de comunicación con nuestros pacientes y que las herramientas utilizadas hasta ahora para ello no han sido todo lo útiles que se esperaban. La única fuente de información disponible para nuestros pacientes sobre las técnicas de reproduccion asistida, a parte de la facilitada por los propios centros, son los registros nacionales de actividad.

Aunque el registro de la SEF (Luceño et al., 2010) recoge datos sobre DGP, éstos no son lo suficientemente detallados para obtener información precisa sobre el DGP en enfermedades de aparición tardía. Creemos que el registro y otros proyectos puestos en marcha por ASEBIR sobre DGP paliarán este déficit (Boada y Grossmann, 2010). Es de desear que la información recabada por este registro esté a disposición de los pacientes y sirva para recortar la distancia que separa a profesionales y pacientes en este campo. Para que el DGP en este tipo de enfermedades sea una herramienta demandada por nuestros pacientes, es necesario que éstos dispongan de toda la información necesaria para una toma de decisiones informada. Y para ello es fundamental que los profesionales tomemos conciencia de la necesidad de cambiar nuestros modelos y canales de información a pacientes (Cabello et al., 2009; Gomez-Palomares et al., 2010) y desterrar de una vez por todas actitudes (Rodriguez et al., 2010) que nos han llevado a esta situación de desencuentro entre pacientes y profesionales. O cambiamos, o nos encontraremos con maravillosas técnicas que los pacientes no están dispuestos a usar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boada M, Grossmann. Documento sobre diagnóstico genético preimplantacional y enfermedades monogénicas elaborado por el grupo de interés en DGP para la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15:6-15.

Cabello Y, Hernández J, Gómez JL, Marqueta J, Vidal E, Fernandez-Shaw S, Herrero J, Luceño F, Coroleu B, Castilla JA. Diez razones para hacer el registro SEF transparente en 2008. Rev Iber Fert 2009; 26 (Supl 3):5-6.

Fortuny D, Balmaña J, Graña B, Torres A, Ramón y Cajal T, Darder E, Gadea N, Velasco A, López C, Sanz J, Alonso C, Brunet J. Opinion about reproductive decisión making among individuals undergoing BRCA ½ genetic testing in a multicentre Spanish cohort. Human Reproduction 2009; 24, 4:1000-1006.

Gomez-Palomares JL Cabello Y, Hernandez J, Fernandez-Shaw S, Vidal E, Herrero J, Luceño F, Marqueta J, Castilla JA, Coroleu B. La nueva vía del registro de actividad de la SEF: El aumento de la calidad. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15:34-35.

Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J el al. Attitudes toward prenatal genetic testing in patients with familial adenomatous polyposis. Am J Gastroenterol 2007; 102:1284-1290.

Lammens C, Bleiker E, Aaronson N, Vriends A, Ausems M, Jansweijer M, Wagner A, Sijmons R, van den Ouweland A, van der Luijt R, Spruijt L, Gómez E, Ruijs M, Verhoef S. Attitude towards pre-implantation genetic diagnosis for hereditary cancer. Fam Cancer 2009; 8:457-464.

Luceño F, Vidal E, Castilla JA, Gómez-Palomares JL, Fernandez- Shaw S, Cabello Y, Hernández J, Herrero J, Marqueta J, Coroleu B. Registro FIV-ICSI de la Sociedad Española de Fertilidad. Año 2008. Rev Iber Fert. 2010; 27 (supl 2):9-37

Menon U, Harper J, Sharma A et al. Views of BRCA gene mutation carriers on preimplantation

genetic diagnosis as a reproductive option for hereditary breast and ovarian cancer. Hum Reprod 2007 ; 22:1573-1577.

Quinn G, Vadaparampil S, Wilson C et al. Attitudes of high-risk women toward preimplantation genetic diagnosis. Fertil Steril 2008; 91:2361-2368.

Rodriguez A, Fabregat A, Rabanal A et al. Transparencia no siempre es sinónimo de honestidad. Rev Asoc Est Biol Rep 2010; 15:31.

Staton AD, Kurian AW, Cobb K et al. Cancer risk reduction and reproductive concerns in female BRCA ½ mutation carriers. Fam Cancer 2008; 7:179-186.

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL PARA ENFERMEDADES DE APARICIÓN TARDÍA

Mireia Florensa
IVI-Barcelona

La corea (o enfermedad) de Huntington fue descrita por primera vez por George Huntington en 1872 en su artículo "On Chorea" donde subrayaba el carácter hereditario de la enfermedad, la tendencia a la locura y al suicidio y su manifestación en la etapa adulta del individuo. Tras casi 140 años de ciencia, estos descubrimientos se han podido redefinir y hoy en día sabemos que se trata de una enfermedad con herencia autosómica dominante que pertenece a la familia de las enfermedades causadas por la expansión de secuencias repetidas de tripletes de nucleótidos. Al igual que la corea de Huntington, se han descrito otras enfermedades de aparición tardía entre las que destacan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar, el insomnio familiar fatal o la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz. Todas ellas son fatales, tienen una penetrancia completa y son de herencia autosómica dominante con lo que existe un riesgo teórico del 50 por ciento de transmisión de la enfermedad a la descendencia. Se trata de enfermedades neurodegenerativas muy severas en las que se sitúa la aparición de los primeros síntomas entre los 20 y los 50 años de edad y para las que, por el momento, no existe cura.

Para los individuos portadores de una mutación responsable de una de estas enfermedades que deseen evitar su transmisión a su descendencia, el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se presenta como una alternativa muy válida al diagnóstico prenatal. El DGP obligará a muchos pacientes sin problemas de fertilidad a someterse a un ciclo de Fecundación in vitro (FIV), con los riesgos y esfuerzos que ello supone, pero evitará la necesidad de interrumpir el embarazo en caso de que el feto sea portador de la mutación. Debido también a su carácter neurodegenerativo irreversible, muchos pacientes con parientes afectos de alguna enfermedad de aparición tardía optan por no conocer su estatus genético pero siguen queriendo asegurarse de que la mutación (en el caso de que la portasen) no es transmitida a sus descendientes. Para estos casos, existen dos modalidades de DGP: el DGP por exclusión y el DGP con no-revelación. El DGP por exclusión consiste en la selección (mediante marcadores familiares) de embriones libres de cualquier alelo proveniente del abuelo/a afecto. De esta manera, ni los pacientes, ni los profesionales encargados de dicho análisis, ni nadie del personal de la clínica de FIV puede conocer el estatus genético del paciente, evitando así cualquier revelación al respecto. El mayor inconveniente de este método es que el 50 por ciento de embriones diagnosticados como afectos (por ser portadores de un alelo proveniente del abuelo) serán en realidad sanos (Sermón et al., 2002; Moutou et al., 2004).

Por otro lado, el DGP con no-revelación consiste en la evaluación del estatus genético del individuo y la realización de un ciclo de FIV, con o sin DGP según el resultado de la evaluación, sin que éste sea revelado al paciente. Este método conlleva complicaciones logísticas puesto que, para evitar cualquier suspicacia, los pacientes no serán informados de ningún aspecto relacionado con el ciclo de FIV; no recibirán información del número de ovocitos obtenido, del número de embriones obtenido tras fecundación, de los embriones biopsiados ni de los transferidos o congelados. Aparte de los problemas inherentes al no poder revelar el resultado del test y la información del ciclo de FIV, a menudo los profesionales se verán forzados a simular una transferencia embrionaria porque no existen embriones sanos para transferir o porque, aunque éstos no hayan sido analizados, ninguno de ellos ha llegado al estadio de blastocisto. En estos casos, para evitar levantar sospechas por parte del paciente, es de vital importancia que el mínimo necesario de personas implicadas en el proceso de FIV sea informado del estatus genético del paciente (Braude et al., 1998). En nuestro país, el grupo de interés de genética y reproducción de ASEBIR ha elaborado un documento al respecto donde se evalúa la mejor aproximación a la hora de abordar estos casos.

Al igual que en el caso de las mutaciones relacionadas con la predisposición al cáncer, la selección de embriones libres de m utaciones relacionadas con una enfermedad de aparición tardía ha originado un largo debate ético. Los defensores del uso del DGP génico para dichos fines enfatizan el carácter grave de estas enfermedades. Éstos argumentan que el hecho de que tiendan a desarrollarse en etapa adulta es irrelevante en relación al uso del DGP y que, habiendo los recursos para evitarlo, sería perverso evitar que las parejas que lo desearan pudieran hacer

uso de dichos recursos (Robertson, 2003). Para los detractores de dicha práctica, el DGP solamente debería ser usado para seleccionar contra enfermedades que pongan en peligro el embarazo o el recién nacido en su etapa de vida más temprana. Además, estos autores consideran éticamente inaceptable asistir al nacimiento de niños en casos en los que muy probablemente uno de los progenitores tendrá una esperanza de vida reducida (Towner y Loewy, 2002; Noble, 2008).

Para ello es de vital importancia que la decisión de realizar un ciclo de DGP para estas enfermedades vaya acompañada siempre de un consejo genético donde se evalúen daños y beneficios adaptados a la particularidad de cada caso. Puesto que muchas de estas enfermedades tienen una penetrancia variable que incluye una edad de aparición y una progresión de la enfermedad variables, el consejo genético debe tener en cuenta no solamente las características de la enfermedad, el estado de dicha enfermedad en el paciente o las posibilidades reproductivas de la pareja, sino también la historia familiar de la enfermedad.

En países como el Reino Unido, el órgano gubernamental que regula el uso del DGP, la Human Fertilisation and Embryology Authority (HFEA), permite el uso de dicha técnica para la selección de embriones sanos para enfermedades de aparición tardía tras evaluar caso a caso las solicitudes que hacen los mismos pacientes (HFEA, 2008). En España, la ley permite la aplicación del DGP para los casos de enfermedades graves, de aparición precoz y no susceptibles de curación. Para el resto de supuestos, se requiere de una autorización expresa caso a caso por parte de la autoridad sanitaria correspondiente previo informe favorable de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA) (ley 14/2006 sobre técnicas de reproducción humana asistida). Debido a la ambigüedad inherente en los conceptos de gravedad y de precocidad relacionada a las enfermedades de aparición tardía, dichos conceptos están siendo revisados constantemente con el fin de adecuarse lo mejor posible tanto a las necesidades de los pacientes y los profesionales como al marco ético y moral de la aplicación del DGP en estos casos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Braude P, De Wert G, Evers-Kiebooms G, Pettigrew R and Geraedts J. Non-disclosure preimplatantion genetic diagnosis for Huntington disease: practical and ethical dilemmas. Prenat Diagn 1998; 18:1422-1427.

Human Fertilisation and Embryology Act 2008. Authority decision on PGD policy. Publicado en 2006 pero accesible online en http://www.hfea.gov.uk.

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. Artículo 12.2 sección b. Publicado en 2006 en el Boletín Oficial del Estado y accesible online en http://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19947-19956.pdf

Moutou C, Gardes N and Viville S 2004. New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. E J Hum Gen 2004; 12:1007-1014.

Noble R. Pandora's box: ethics of PGD for inherited risk of late-onset diseases. Reprod Biomed Online 2008; 17 Suppl 3:55-60.

Robertson JA. Extending preimplantation genetic diagnosis: the ethical debate. Hum Reprod 2003;18:465-471.

Sermon K, De Rijcke M, Lissens W, De Vos A, Platteau P, Bonduelle M, Devroey, Van Steirteghem A and Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease with exclusion testing. E J Hum Gen 2002;10:591-598.

Towner D y Loewy RS. Ethics of preimplantation diagnosis for a woman destined to develop early-onset Alzheimer disease. JAMA 2002; 283:1038-1040.

DIAGNÓSTICO PREIMPLANTACIONAL PARA EVITAR LA APARICIÓN TARDÍA DE ENFERMEDADES

Jorge Cuadros. Clínica FIVMadrid

Recientemente ha nacido el primer niño libre de la mutación BRCA1, que predispone al desarrollo del cáncer de mama, mediante la utilización del diagnóstico genético preimplantacional para la detección de embriones portadores de esta alteración. La autorización de la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida y la autoridad competente fue otorgada al caso; es decir, si alguna otra pareja fuera portadora de la misma alteración genética, debería realizar todo el proceso de solicitar una autorización específica para su caso.

Desde algunos círculos, ajenos a la actividad científica, se ha cuestionado esta posibilidad de acceder a las técnicas de diagnóstico para identificar los embriones portadores de la mutación, que podrían dar lugar a niños con una alta probabilidad de desarrollar la enfermedad. El cuestionamiento se debe al hecho de que no es seguro que se desarrolle la enfermedad, sino sólo una probabilidad. El trabajo de los responsables de dar los permisos, y de allí la necesidad de la autorización caso a caso, es determinar si la probabilidad de que la enfermedad ocurra es más o menos alta, en función por ejemplo de la historia familiar.

Efectivamente, podría ser válido realizar un planteamiento ético, desde que la selección de los embriones portadores de la mutación podría segregar embriones que nunca desarrollarían la enfermedad. Pero esto es válido desde un punto de vista teórico. La realidad, al menos en los casos que ya han sido autorizados, es que la probabilidad de desarrollo de un cáncer de mama es muy elevada. Por lo tanto, la pregunta sería ¿es ético tener la posibilidad de evitar una enfermedad grave, como el cáncer, y no hacerlo?

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIÓN EN PACIENTES CON RIESGO DE PADECER LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Vendrell X., Giménez C., Martin J., Fernández, E., Velilla E.
Grupo de interés en Genética y Reproducción de ASEBIR

La Enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad incurable y degenerativa que causa la muerte de los pacientes tras 16 años, de media, desde la aparición de los primeros síntomas. La enfermedad debuta entre la tercera y cuarta década de la vida y esto provoca que muchas de las parejas con riesgo de trasmitir la enfermedad planeen tener descendencia, y consideren el DGP como su mejor opción reproductiva. En estas circunstancias, es muy frecuente que las personas con riesgo manifiesten dos deseos: tener descendencia sana y no conocer su propio estatus genético.

Este derecho a "no saber" está basado en el principio de autonomía y debe ser garantizado de forma universal tal como recogen diferentes consensos internacionales y legislaciones específicas de diferentes países. No obstante, puede existir alguna objeción a este derecho. La principal razón que limita este derecho radica en que su ejercicio pueda perjudicar a otros. En este sentido, la pareja y la descendencia de una persona con riesgo que no quiera conocer su estatus genético pueden verse directamente involucrados. Indirectamente, en los países en los que el sistema público sufraga los gastos del procedimiento, el propio sistema puede verse perjudicado. Algunos autores apelan al principio de "solidaridad social". Si un paciente con riesgo realmente no es portador de la mutación responsable, se estaría sometiendo a unas técnicas costosas e innecesarias. En contrapartida, el nacimiento de una persona sana tras DGP evita los gastos médicos directos asociados a la enfermedad.

Este escenario complejo ha generado, y sigue generando, un debate ético, social e incluso legal en muchos países. En este contexto, los componentes del Grupo de Interés en Genética Reproductiva de ASEBIR nos encontramos muy a menudo inmersos en este debate. Con el objeto de conciliar el derecho a no saber con evitar la transmisión de la enfermedad, se elaboró un documento de consenso pionero en España y en los países de nuestro entorno. Este documento revisa las diferentes aproximaciones diagnósticas que han sido propuestas en relación con el DGP y la EH. Finalmente emitimos unas recomendaciones que pretendemos puedan llegar al mayor número posible de usuarios y equipos biomédicos implicados en este proceso. Este documento será presentado en breve a la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida para su aprobación.

Documento de consenso:

> *"Diagnóstico Genético Preimplantación en pacientes con riesgo de padecer la Enfermedad de Huntington"*.
>
> Documento de Consenso del Grupo de Interés en Genética Reproductiva (GiGR) de ASEBIR

Autores: Xavier Vendrell, Carles Giménez, Julio Martín, Esther Fernandez, Esther Velilla

Miembros del Grupo de Interés en Genética Reproductiva de ASEBIR: Joan Blanco, Fernando Bronet, Cristina Camprubí, Paula Eibes, Esther Fernández, Silvia Fernández, Elena García, Carles Giménez, Mª Carmen Martínez, Laura Peralta, Mónica Parriego, Mª Carmen Rubio, Joaquin Rueda, Mireia Sandalinas, Esther Velilla, Xavier Vendrell

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El Diagnóstico Genético Preimplantación (DGP), en combinación con las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV), es una técnica consolidada para evitar la transmisión de enfermedades genéticas a la descendencia. En el caso de las enfermedades monogénicas, una de las premisas que debe cumplirse para la aplicación de este tipo de diagnóstico, en el marco de un proyecto reproductivo, es el conocimiento del estatus genético de los futuros padres para la enfermedad que se pretende descartar en los embriones.

En el contexto del acto médico, la decisión de un paciente de ejercer su derecho sobre aceptar o rechazar recibir información, mayoritariamente tiene implicaciones únicamente para dicho paciente. No obstante, en determinadas enfermedades y en especial en las de causa genética, esta decisión puede interferir con su adecuado manejo clínico e incluso presentar un riesgo para otros miembros de la familia y/o para su descendencia.

En este escenario, la Enfermedad de Huntington (EH) resulta un ejemplo paradigmático. La decisión de un individuo de no conocer su estatus genético a riesgo de padecer EH, podría comprometer o retrasar su cuidado y potencialmente situar a otras personas en riesgo. Por otro lado, también afectará a los profesionales sanitarios que interaccionan con estos pacientes. No obstante, el paciente tiene derecho a no querer conocer su estatus genético.

En el contexto del DGP, el deseo de descendencia sana en parejas con antecedentes familiares de EH, es una de las demandas más habituales. En muchos de los casos, los individuos con riesgo de padecer la enfermedad manifiestan su deseo expreso de no conocer su estatus genético. En estos casos el adecuado asesoramiento genético resulta de radical importancia para el correcto manejo de estas parejas.

El objetivo del presente documento es doble. En primer lugar, revisar las aproximaciones diagnósticas consensuadas a nivel nacional e internacional en relación con los estudios genéticos presintomáticos de la EH y proveer de unas recomendaciones para los casos de DGP de la Enfermedad de Huntington en los que los pacientes solicitan no conocer su estatus genético. En segundo lugar, solicitar que la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida apoye la propuesta recomendada por el GiGR respecto la metodología de diagnóstico de las peticiones de DGP realizadas por parejas a riesgo de EH que no desean conocer su estatus genético, siendo que dicho método, DGP de

exclusión, quede incluido dentro de los supuestos que recoge el artículo 12.1a de la Ley 14/2006.

2. LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La Enfermedad de Huntington consiste en una alteración neurodegenerativa progresiva provocada por una muerte neuronal selectiva a nivel de la corteza cerebral. Se caracteriza por la aparición de movimientos involuntarios irregulares (*corea*), demencia, cambios de personalidad y afectación psiquiátrica. La edad media de aparición es de 40 años. La enfermedad es incurable y causa la muerte a los 16 años de media, tras la aparición de los primeros síntomas.

La EH es una enfermedad genética y hereditaria que se transmite con un patrón de herencia autosómico dominante. El 50% de la descendencia de una persona afecta tiene riesgo de heredar/padecer la enfermedad. La prevalencia de la enfermedad se estima entre 3-7/100.000 en la población europea.

La mutación responsable es una expansión del triplete CAG en el primer exón del gen *HTT* (también conocido como *IT15* o *HD*) localizado en el cromosoma 4 (4p16.3). Existen tres presentaciones alélicas. Los alelos del gen *HTT* se clasifican como normal, premutado, o patológico en función del número de repeticiones del triplete CAG: 1) alelo normal, 26 o menos repeticiones, 2) alelo premutado, de 27 a 35 repeticiones y 3) alelo patológico, 36 o más repeticiones. En la mayoría de los casos la enfermedad debuta en la edad adulta con un rango de 45-55 repeticiones. No obstante se han descrito manifestaciones más tempranas con unas repeticiones del orden de 60. Se considera que tener un alelo con 40 o más repeticiones corresponde con una penetrancia completa. Existe un rango patológico de repeticiones, entre 36 y 39, que presenta una penetrancia incompleta.

El tamaño de la expansión varía de generación en generación por extensión o contracción debido a inestabilidad del triplete CAG de tamaño anormal; esta tendencia a incrementarse de una generación a la siguiente explica el fenómeno conocido como *anticipación* observado en la EH: mayor severidad y debut más temprano de una enfermedad hereditaria en la siguiente generación.

La inestabilidad del triplete CAG es especialmente importante en la transmisión paterna; de hecho la EH de aparición juvenil, donde se detectan grandes expansiones, se debe mayoritariamente a una transmisión paterna. No obstante, y a pesar de que existe una correlación inversa entre el tamaño de la expansión y la edad de aparición de los primeros síntomas, la longitud de las repeticiones CAG no explica completamente la variabilidad en la edad de aparición, el fenotipo clínico o la progresión de la enfermedad. Esto sugiere la existencia de otros factores que juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad.

3. RECOMENDACIONES SOBRE EL DIAGNÓSTICO PRESINTOMÁTICO DE LA EH

En relación con el test presintomático o predictivo, existen unas directrices internacionales publicadas por la *International Huntington Association* y la *World Federation of Neurology Research Group on Huntington's Chorea* y la *National Society of Genetic Counselors*, que se vienen utilizando por la comunidad biomédica como ayuda y recomendación para resolver los problemas éticos asociados a un estudio genético presintomático en una enfermedad de aparición en la edad adulta.

Las directrices pretenden preservar la autonomía, la confidencialidad y la privacidad del paciente y ponen especial énfasis en el manejo de estos casos. En particular destacan el hecho de que los estudios presintomáticos de la EH en todos los países deben estar precedidos de un asesoramiento genético especializado, que debe contar con la participación de un genetista, un psicólogo, un neurólogo y un experto en asesoramiento genético. En este sentido, estas unidades especiales deben garantizar que las personas con riesgo de padecer la enfermedad reciban una adecuada educación previa al estudio, un asesoramiento genético y un seguimiento después de recibir los resultados del estudio. Es importante destacar que no existen recomendaciones específicas dirigidas a los casos de DGP de EH. Este hecho es el que motiva la redacción de este documento de recomendación consensuado entre expertos nacionales en DGP.

4. OPCIONES REPRODUCTIVAS EN PACIENTES CON RIESGO DE PADECER EH

Los individuos que presentan riesgo de padecer EH se enfrentan a decisiones complejas durante su planificación familiar. En muchas ocasiones, la decisión sobre realizarse o no el estudio presintomático se plantea en las parejas cuando deciden tener descendencia. En ese momento es frecuente que las parejas contemplen el hecho de no querer conocer su estatus genético, pero, al mismo tiempo, deseen tener descendencia sana. El hecho de no querer conocer el propio estatus genético en relación con una enfermedad, está recogido en normas nacionales e internacionales, en particular la Ley Básica Reguladora de la Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones (Ley 41/2002), La ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007) y la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos: "*Debe ser respetado el derecho de cada individuo a decidir si es informado, o no, de los resultados de los estudios genéticos y las consecuencias que de ellos se deriven*" (artículo 5c).

Básicamente distinguimos las siguientes opciones reproductivas:

1. Tener hijos con una carga genética ajena a la pareja, mediante donación de gametos y/o adopción.

2. Asumir el riesgo de una posible transmisión de la enfermedad a la descendencia.

3. Evitar la posible transmisión de la enfermedad a la descendencia. En este último supuesto, pueden optar por el diagnóstico prenatal o la selección embrionaria mediante técnicas de DGP.

En el caso que se desee evitar la posible transmisión a la descendencia, las opciones que contempla el diagnóstico prenatal están ampliamente recogidas en las recomendaciones citadas y en la literatura, y no son el objeto del presente documento. Por el contrario, respecto al DGP, en combinación o no con el estudio presintomático previo, no está discutido en las directrices y recomendaciones, y es el objeto del presente documento de consenso.

5. OPCIONES DE DGP EN PACIENTES CON RIESGO DE PADECER EH

A) Escenario 1. Pacientes que aceptan el estudio presintomático y consienten en conocer su estatus genético. "DGP directo"

La realización del estudio presintomático tiene una tasa de detección cercana al 100%. Desde el punto de vista reproductivo, el manejo de estos pacientes que se someten a este estudio deben seguir las recomendaciones descritas. Si resultan portadores de una expansión patológica, son debidamente informados acerca de la evolución de la enfermedad. En este caso concreto, el DGP está encaminado a conocer el estatus genético de los embriones generados mediante técnicas de FIV con los gametos de la pareja. Sólo aquellos embriones libres de la enfermedad se transfieren al útero materno.

B) Escenario 2. Pacientes que aceptan el estudio presintomático y rehúsan conocer su estatus genético. "DGP de no revelación".

En este supuesto inicialmente se procede de la misma forma, realizando el estudio presintomático. No obstante, los padres consienten no conocer el resultado del estudio sabiendo que, independientemente del resultado del estudio presintomático, la pareja se tendrá que someter a las técnicas de FIV. Si el estudio presintomático es positivo, se procede al DGP directo de la EH, como en el supuesto anterior. Si el estudio es negativo, los embriones no son analizados genéticamente, por no existir riesgo de transmisión de la enfermedad, y todos son susceptibles de ser transferidos al útero materno. Ambas situaciones tienen en común el hecho de requerir una eficaz custodia de la información genética para que no sea revelada a los pacientes; asimismo, esta opción lleva implícito una comunicación limitada de toda la información clínica relacionada con el ciclo de FIV, a fin de evitar a los interesados conjeturas respecto de su estatus genético.

Debido a lo anterior, se ha planteado un debate ético en relación con este tipo de aproximación. En el caso de que el estudio presintomático resulte negativo, se genera un dilema en los profesionales que intervienen en el proceso, ya que dicho resultado anula la indicación clínica de someterse a técnicas invasivas como la FIV, cuando no existe ningún riesgo de transmisión de la enfermedad. Por otra parte, si el estudio presintomático resulta positivo, debería garantizarse que en todos los ciclos existan embriones disponibles para la transferencia. En caso contrario, si no se realiza la transferencia embrionaria, indirectamente se estaría revelando al paciente su estatus de portador. Para evitar esta situación, se debería recurrir a estrategias que aseguren al máximo la existencia de embriones disponibles para la transferencia. En este sentido, el desarrollo de las técnicas de vitrificación de ovocitos/embriones puede permitir la obtención del máximo número de embriones disponibles para el estudio genético. No obstante, debe tenerse en cuenta que la aplicación de estas técnicas de vitrificación es posible que no resulte eficaz en todos los casos.

C) Escenario 3. Pacientes que rehúsan el diagnóstico presintomático. "DGP de exclusión".

En este escenario, no se realiza el estudio directo del gen de Huntington. Se recurre al estudio genético familiar indirecto de la transmisión del gen asociado a la EH. El objetivo del estudio indirecto es garantizar que ninguno de los implicados en el proceso conozca el estatus genético del paciente a riesgo. En este supuesto, se requiere de la participación de familiares del miembro de la pareja a riesgo. Con las conclusiones del estudio, durante el DGP, los embriones que hereden la copia del gen del abuelo/a afectado/a, se consideran embriones potencialmente con riesgo de padecer la enfermedad y no son considerados para la transferencia al útero materno.

La limitación principal de este supuesto consiste en que, al igual que en el supuesto anterior, para el 50% de los casos la pareja no tiene riesgo genético, y tampoco existiría indicación clínica de someterse a técnicas invasivas como la FIV combinada con DGP.

Las principales ventajas de esta opción son, por un lado, que el personal sanitario implicado en el proceso no conoce el verdadero estatus genético del paciente, minimizando así dilemas éticos y, por otro, desaparece el problema de la custodia de la información genética. Finalmente, otra gran ventaja es el hecho de que los pacientes pueden recibir información completa sobre los resultados clínicos de su tratamiento.

6. RECOMENDACIÓN DEL GRUPO DE INTERÉS EN GENÉTICA REPRODUCTIVA DE ASEBIR

El DGP en pacientes con antecedentes familiares de EH es una de las peticiones más habituales de las parejas que acuden a los centros de reproducción asistida. Es evidente que el escenario 1 representa la mejor opción desde el punto de vista reproductivo. No obstante, la voluntad de no conocer el propio estatus genético es un derecho del paciente. En este sentido, en opinión del GiGR de ASEBIR, el escenario 3, conocido como "DGP de exclusión", permite conciliar el derecho de no conocer el estatus genético de un paciente y el deseo de tener descendencia sana. Además, permite atenuar el dilema ético de los profesionales que intervienen en el proceso.

El "DGP de exclusión" permite resolver los tres puntos de conflicto que presentan las parejas con riesgo de transmisión de la EH, que no quieren conocer su estatus genético pero quieren evitar el riesgo de transmisión de la enfermedad a la descendencia:

1) Permite tener descendencia propia, sin acudir a otras opciones genéticamente no emparentadas.

2) Respeta el deseo de no conocer el estatus genético de los pacientes.

3) Permite evitar la transmisión de la enfermedad.

Basándonos en los argumentos anteriores, y sabiendo que el escenario 3 según la vigente Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida, queda incluido en el punto 2 del artículo 12 sobre diagnóstico genético preimplantación, y, por tanto, con el consiguiente requisito de su autorización expresa, manifestamos nuestra recomendación de valorar la posibilidad de incluir el diagnóstico genético preimplantación de la enfermedad de Huntington mediante DGP de exclusión dentro del punto 1a del citado artículo 12.

ASEBIR
VI CONGRESO GIRONA 2011

COMITÉ DE HONOR

Excma. Sra. Dña Anna Pagans Gruartmoner
Alcaldesa de Girona
Excma. Dra. Dña. Anna María Geli de Ciurana
Rectora Mgfca. de la Universidad de Girona
Dra. Dña. Anna Veiga Lluch
Socia Fundadora de ASEBIR
Presidenta de la Asociación del año 1993 al 2003
En la actualidad Presidenta de la ESHRE

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente
Joan Sarquella i Ventura

Vocales
Begoña Aran
Sergi Bonet
Joan Carrera
María Fernández Reig
Eugenia Francisco-Busquets
Nuria Gimbernat
Marck Grossmann
Mariona Hugas
Nuria Porcar
Anna Rabanal
Mª José Torelló
Fanny Vidal

COMITÉ CIENTÍFICO

Vocales
Santiago Álvarez
Montse Boada
Dolors Company
Mª José de los Santos
Esther Fernández
Emilio Gómez
Antonio L. González-Utor
Carles Gimènez
María Dolores Lozano
Yolanda Minguez
Imma Molina
Alberto Pacheco
Mario Sousa
Antonio Urries

SECRETARÍA TÉCNICA

GRUPO PROCESS marketing & formación

Betaprocess, S.L.
C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1º, 6ª - Madrid 28037
Telf.: +34 91 377 14 23 / Fax: +34 91 377 49 65
E-mail: vicongreso@asebir.com

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

ASEBIR

VI CONGRESO GIRONA 2011

CRÉDITOS Y AUSPICIOS

• Actividad **Acreditada** por el Consejo Catalán de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias – Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud, con 1,4 Créditos, (Actividad de Formación Continuada registrada con el número 09/02940-BQ)

• Congreso **Auspiciado** por:

- La Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva (ASESA)
- La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (S.E.G.O.)
- La Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)
- La Sociedad Española de Fertilidad (S.E.F.)
- La Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM)

CURSOS PRECONGRESO

Miércoles, 5 de Octubre de 2011

• **Curso nº 1.** Gestión de Calidad en el Laboratorio de Embriología Clínica

• **Curso nº 2.** Biotecnología de la Reproducción: del Modelo Animal al Modelo Humano

• **Curso nº 3.** Fundamentos de Genética Básica para Embriólogos

PROGRAMA CIENTÍFICO

VI CONGRESO GIRONA 2011

MIÉRCOLES, 5 DE OCTUBRE DE 2011

15:00 - 20:00 hrs. Apertura de Secretaría

16:00 - 16:40 hrs. Bienvenida y recogida de documentación

16:40 - 17:00 hrs. Inauguración oficial del VI Congreso Nacional ASEBIR

17:00 - 19:00 hrs. Sesión de Andrología.

Moderadores: Dr. Fernando Marina (CEIFER, Barcelona) y Dra. Margarida Esbert (IVI, Barcelona)

17:00 - 17:40 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Andrología.

Ponente Dr. Alberto Pacheco, IVI Madrid

17:40 - 18:20 hrs. Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante separación magnética

Ponente Dra. Sonja Grunewald, Universitätsklinikum Leipzig, Leipzig, Germany

18:20 - 19:00 hrs. Nuevas técnicas de selección de espermatozoides: Selección mediante IMSI

Ponente Dra. Manuela Alonso, IVI Madrid

19:00 - 19:30 hrs. Pausa y visita Pósters.

19:30 - 20:30 hrs. Comunicaciones Orales Andrología. (6 comunicaciones)

Moderadores: Dr. José Antonio Castilla (H. U. Virgen de las Nieves, Granada) y Dra. Mariona Hugas (Clínica Girona, Girona)

20:30 hrs. Cocktail Inaugural en el Auditori Palau de Congressos

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

JUEVES, 6 DE OCTUBRE DE 2011

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

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

Moderadores: Dra. Mª José Torelló (H. Quirón, Barcelona) y Dra. Inmaculada Molina (H. U. La Fe, Valencia)

09:00 - 09:40 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Embriología.

Ponente Dra. Mª José de los Santos, IVI Valencia

09:40 - 10:20 hrs. Técnicas de diagnóstico no invasivo de selección embrionaria.

Ponente Dr. Mark Graham Larman, Vitrolife, Colorado (USA)

10:20 - 11:00 hrs. Uso en el laboratorio de la catalogación embrionaria de ASEBIR. Estado actual.

Ponente Dra. Victoria Hurtado de Mendoza, Centro Másvida Reproducción, Sevilla

11:00 - 11:30 hrs. Pausa café.

11:30 - 12:30 hrs. Comunicaciones Orales Embriología (6 comunicaciones)

Moderadores: Dra. Yolanda Mínguez (IVI, Madrid) y Dr. Emilio Gómez (TAHE Fertilidad, Murcia)

12:45 - 13:30 hrs. Symposium Satélite EMB

IVF Witness. RFID (Radio frequency identification) technology to reduce the risk of IVF errors

Ponente Dr. Ronny Janssens. Centre for Reproductive Medicine, UZB, Brussels.

(El simposium contará con traducción simultánea)

13:30 - 15:30 hrs. Comida congresual

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

15:30 - 17:30 hrs. Sesión de Calidad.

Moderadores: Dr. Juan Manuel Moreno (Clínica Vistahermosa, Alicante) y Dra. Laura Marqués (Clínica Sagrada Familia, Barcelona)

15:30 - 16:10 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida

Ponente Dr. Antonio L. González-Utor, Centro Masvida Reproducción, Sevilla

16:10 - 16:50 hrs. Medidas de seguridad en el manejo de las muestras biológicas

Ponente Dra. Montse Boada, Institut Universitari Dexeus, Barcelona

16:50 - 17:30hrs. Control de calidad en los procesos del laboratorio de embriología

Ponente Dr. Klaus Wiemer, Northwest Center for Reproductive Sciences, Seattle, USA

17:30 - 18:00 hrs. Pausa y visita Pósters

18:00 - 19:00 hrs. Comunicaciones Orales Calidad del Laboratorio de Reproducción Asistida (6 comunicaciones)

Moderadores: Dr. Mark Grossmann (Centro Médico Teknon, Barcelona) y Dr. Yosu Franco (Centro Sanitario Virgen del Pilar, San Sebastián)

VIERNES, 7 DE OCTUBRE DE 2011

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

09:00 - 11:00 hrs. Sesión de Genética.

Moderadores: Dr. Josep Santaló (UAB, Barcelona) y Dr. Julio Martín (IVI, Valencia)

09:00 - 09:40 hrs. Estado actual del Grupo de Interés de Genética y Reproducción

Ponente Dra. Esther Velilla, Centro de Medicina Embrionaria, Barcelona

09:40 - 10:20 hrs. Aplicación del array-CGH en el screening de aneuploidías

Ponente Dra. Mireia Sandalinas, Reprogenetics Spain, Barcelona

10:20 - 11:00 hrs. Estandarización de las técnicas de biología molecular al DGP

Ponente Dra. Esther Fernández, Geniality Diagnostico Genético, Madrid

11:00 - 11:30 hrs. Pausa café

11:30 - 12:30 hrs. Comunicaciones Orales Genética (6 comunicaciones)

Moderadores: Dra. Francesca Vidal (UAB, Barcelona) y Dr. Fràncics Xavier Vendrell (Sistemas Genómicos, Valencia)

12:30 - 13:15 hrs. Symposium Satélite ORIGIO

Physiologic ICSI

Ponente Dr. Lodovico Parmegiani. GynePro Medical Centers, Bologna, Italy.

(El simposium contará con traducción simultánea)

13:15 - 14:15 hrs. XXV Asamblea de Socios ASEBIR

14:15 - 16:00 hrs. Comida congresual

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

16:00 - 16:40 hrs. Exposición 4 Pósters seleccionados para discusión

Moderadores: Dra. Carmen Ochoa (CER. Clínica Cotero Santander, Santander) y Dra. Mª Dolores Lozano (H. U. Virgen del Rocío, Sevilla)

16:40 – 17:20 hrs. Aula Virtual

Moderadores: Dra. Gemma Arroyo (I. U. Dexeus, Barcelona) y Dra. Mercé Durban (Clínic Eugin, Barcelona)

Embryoscope

Ponente Dr. Marcos Meseguer, IVI Valencia

17:20 - 18:00 hrs. Sesión de Debate

Moderadores: Dr. Jorge M. Cuadros (FIV-Madrid, Madrid) y Dra. Gloria Calderón (IVI, Barcelona)

Embriólogos clínicos: ¿somos realmente lo que queremos ser?

Ponente Dr. Antonio Urries, Clínica Quirón, Zaragoza

18:00 - 18:30 hrs. Pausa y visita Pósters

18:30 - 18:45 hrs. Premio ASEBIR al Mejor Póster 2011

18:45 - 19:05 hrs. Exposición Premios ASEBIR-EMB 2009

Moderadores: Dra. Anna Rabanal (Barcelona IVF, Barcelona) y Dr. Ignacio Santiago Álvarez (IERA, Badajoz)

18:45 - 18:55 hrs. Premio ASEBIR-EMB 2009 de Embriología Clínica

Aplicación de la tecnología del embrioscope para la cuantificación de la calidad ovocitaria mediante el análisis de los patrones de respiración.

Ponente Dr. Javier Herrero Zapata, IVI Valencia

18:55 - 19:05 hrs. Premio ASEBIR-EMB 2009 de Investigación Básica

Hibridación genómica comparada en célula única (SC CGH): nueva herramienta para el screening genético preimplantacional (SGP).

Ponente Dra. Belén Lledo Bosch, Instituto Bernabeu, Alicante

19:05 - 19:15 hrs. Clausura VI Congreso Nacional ASEBIR 2011

21:30 hrs. Cena de Clausura, anuncio y entrega de los Premios ASEBIR-EMB 2011

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS: ¿PASADO, PRESENTE Y/O FUTURO EN LA MEDICINA REGENERATIVA?

EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT CELLS: PAST, PRESENT AND/OR FUTURE IN THE REGENERATIVE MEDICINE?

José Luis Cortés* y José Luis García-Pérez. Banco Andaluz de Células Madre. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Campus de la Salud. Granada.
*e-mail: jlcortes@fundacionhvn.org

RESUMEN

Actualmente, los estudios en medicina regenerativa están dirigidos a la investigación y conocimiento de las células pluripotentes inducidas (iPSCs). Para algunos, son las células llamadas a coger el relevo de las células madre embrionarias (ESCs), que hasta hace poco fueron el objetivo principal de investigación en este campo de la biomedicina. Un análisis de las ventajas e inconvenientes de cada tipo de células, así como un estudio de los factores que las limitan, es necesario para establecer una visión real de las expectativas creadas, que sigue siendo la aplicación de este tipo de células en terapia celular. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):55-61.

Palabras clave: células madre embrionarias, células pluripotentes inducidas, diferenciación, medicina regenerativa, pluripotente, reprogramación

SUMMARY

At present, most regenerative medicine studies are centered in the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs). According to some of them, these cells represent the substitute of embryonic stem cells (ESCs), which until recently were the main research objective in Biomedicine. A critical analysis of the advantages and disadvantages of each cell type is truly needed for the establishment of a real view of the great expectative generated: their application in cellular replacement therapies. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):55-61.

Key words: embryonic stem cell, induced pluripotent cells, differentiation, regenerative medicine, pluripotent, reprogramming

ESCALADO IMPACIENTE DE LA CIENCIA

Cuando los niños van a la escuela y asisten a las clases de matemáticas, raro es el maestro que no aconseja aprender esta asignatura peldaño a peldaño, como si de una escalera se tratara, haciendo énfasis en que si se falla en la asimilación o base de conceptos, es posible que tengan que subir esa escalera imaginaria de una manera menos firme, y la progresión del niño comience a fallar.

Con la Investigación Biomédica no pasa lo mismo. Es muy frecuente que antes de adquirir los conocimientos plenos sobre algunos tipos de comportamientos moleculares, celulares o incluso tisulares que ocurren en nuestro organismo, la Ciencia de un paso más allá, creándose nuevas perspectivas y vías de investigación que, en muchos casos, dan giros radicales en los enfoques originados inicialmente.

Respecto a las investigaciones en Medicina Regenerativa y sus posibles aplicaciones, sobre todo en el campo del transplante alogénico y autogénico, tenemos uno de los mejores ejemplos. Nos referimos a las investigaciones con células madre embrionarias humanas (hESCs), y su intento de sustitución por las células pluripotentes inducidas (iPSCs), originadas a partir de células diferenciadas, y que soportan una carga ética y moral menor que las primeras.

CÉLULAS MADRE, TRONCALES O STEM CELLS

A pesar de su diferente origen, todas las células troncales, o células madre, comparten una serie de características comunes, si bien pueden expresarlas en distintos grados (Liew et al., 2005):

- **Indiferenciación:** las células madre son células indiferenciadas que no poseen las características fenotípicas propias de los tipos celulares diferenciados que integran los diferentes tejidos de un organismo adulto. Presentan una morfología redondeada o fusiforme y carecen de estructuras citoplasmáticas peculiares (citoesqueleto desarrollado, predominio específico de algunos orgánulos, diferenciaciones de membrana, etc.) que son propias de los tipos celulares diferenciados que integran los distintos órganos.

- **Capacidad de autoperpetuación:** las células madre o troncales tienen capacidad para perpetuarse, mediante divisiones mitóticas que originan nuevas células, de características similares. A través de este proceso, una célula madre puede proliferar para dar lugar a una numerosa población de células troncales. Igualmente, un conjunto limitado de células madre, en el seno de un determinado tejido u órgano, puede mantener su número o incrementarlo

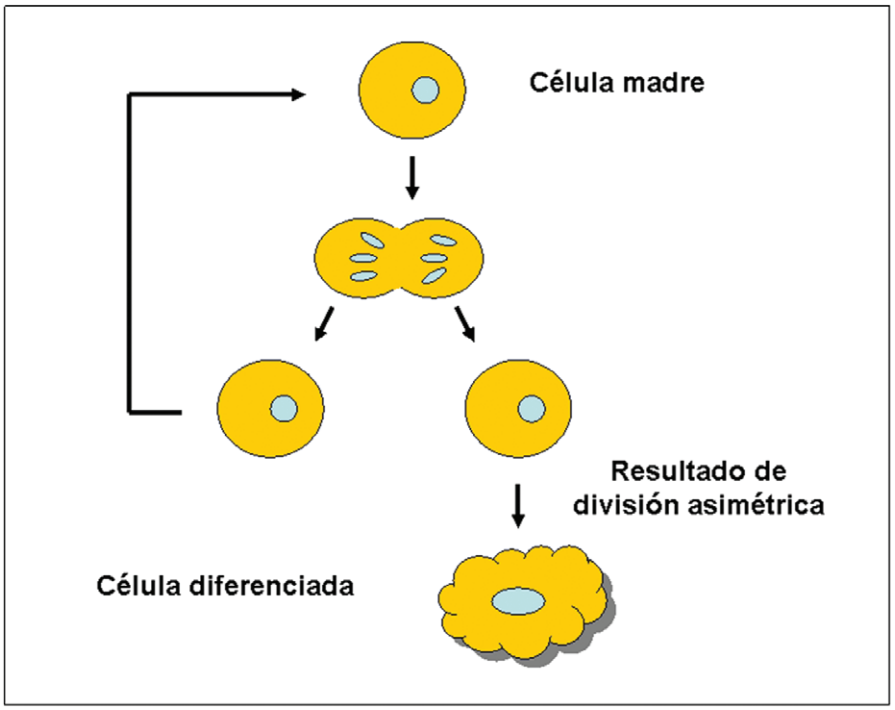


Figura 1: Comportamiento de una célula madre tras una división simétrica y asimétrica (Imagen tomada del Banco Andaluz de Células Madre [BACM]).

ante necesidades específicas, aún cuando tales células estén participando en un proceso de regeneración tisular.

- **Posibilidad de diferenciación:** las células troncales pueden, ante determinadas condiciones experimentales o de forma natural *in vivo*, abandonar su estado indiferenciado y transformarse, mediante un proceso de diferenciación, en alguno de los tipos celulares adultos, propios de los distintos tejidos y órganos. De este modo, pueden dar lugar a células nerviosas, cardíacas, secretoras o sanguíneas, adquiriendo las características morfológicas y funcionales propias de estos tipos celulares. Esta posibilidad, junto con su capacidad de proliferación, es lo que convierte a las células madre en una fuente importante para la obtención de tipos celulares, facultándolas para tratar mediante terapia regenerativa las alteraciones que se producen en algunos tipos de enfermedades.

Las características antes mencionadas dibujan un esquema (Figura 1), como un microchip en blanco, capaz de ser programado para la realización de una función determinada y con la posibilidad de contar previamente con una gran cantidad de ellos de forma natural, antes de iniciar la programación correspondiente. Son, sin duda, estas características las que han hecho fijar en las células madre el centro de atención de la biomedicina actual.

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

Desde que se obtuvieron los primeros cultivos de células embrionarias de ratón derivadas de blastocistos en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), se sentaron las bases para el desarrollo de las metodologías necesarias que conducirían más tarde a generar células embrionarias humanas con características similares a las del ratón.

A estas células embrionarias aisladas se las denominó células madre o troncales embrionarias (ESCs, por *Embryonic Stem Cells*). Cuando en noviembre de 1998, el grupo estadounidense liderado por James Thomson publicó los primeros datos sobre la derivación de líneas de células madre embrionarias humanas (hESCs) a partir de blastocistos en fase de preimplantación (Figura 2), se abrió una nueva puerta de esperanza para la curación de numerosas enfermedades hasta ahora incurables (Thomson et al., 1998). Este grupo consiguió 5 líneas de hESCs a partir de 14 masas celulares internas (ICM), mediante la técnica de inmunocirugía (Solter y Knowles, 1975), y utilizando un cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Todas las líneas fueron caracterizadas mediante métodos fenotípicos y genotípicos, confirmando entre otras características la capacidad de diferenciación de estas células hESCs a cualquier tipo celular.

Además de su interés en Medicina Regenerativa, este tipo de células suponen una herramienta de enorme valor para el "*screening*" de nuevos fármacos, así como un modelo para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa embrionaria, y para estudiar procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario humano (Menendez et al., 2006).

Las características esenciales que permiten que una célula se defina como

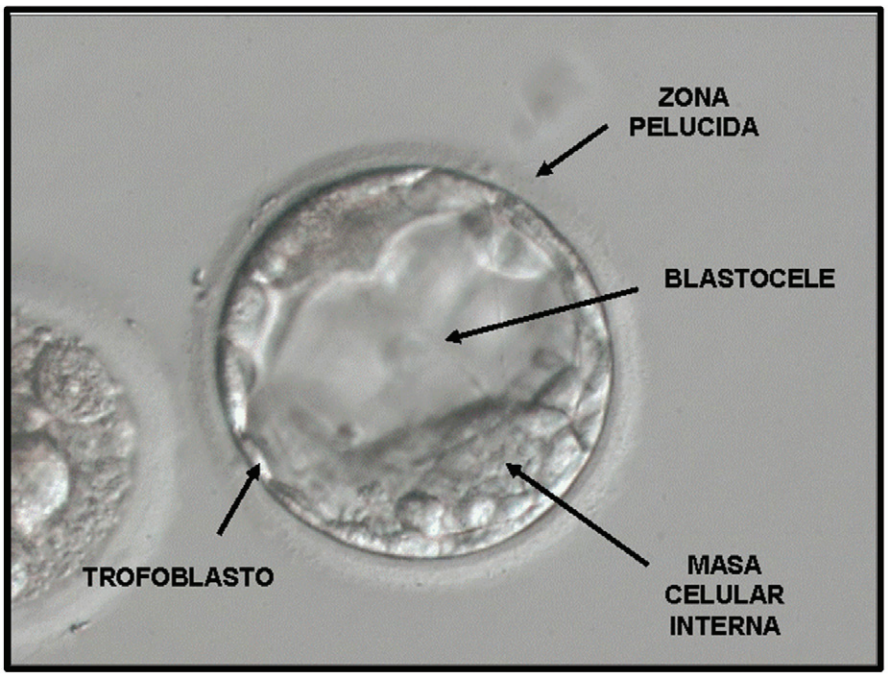


Figura 2: *Ejemplo de blastocisto humano donde se detallan las diferentes partes del mismo, destacando la masa celular interna (ICM), de donde se obtiene las hESCs (Imagen tomada del BACM).*

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

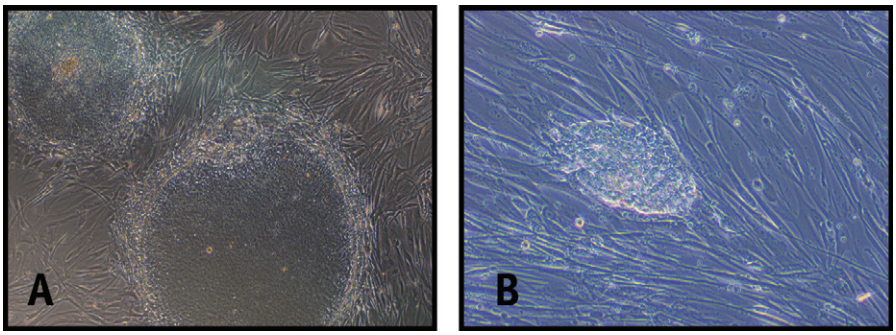


Figura 3: *Ejemplos de colonias de (A) células madre embrionarias humanas (hESCs), y (B) células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). (Imágenes tomadas del BACM).*

ESC se pueden reducir a las siguientes (Alonso-Bedate, 2004):

1) Se derivan de células de la MCI del blastocisto (Figura 2).
2) Son células diploides estables y poseen un cariotipo normal cuando se cultivan *in vitro*.
3) Se pueden propagar de forma indefinida en el estado embrionario y por tanto son capaces de experimentar un número ilimitado de divisiones simétricas sin diferenciarse (Figura 3A).
4) Se pueden diferenciar de forma espontánea para dar lugar a múltiples células que pe rtenecen a las tres capas de células germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).
5) Se pueden diferenciar tanto si son transplantadas a un embrión temprano como a uno tardío, es decir, son capaces de integrarse en todos los tejidos fetales durante el desarrollo.
6) Se pueden diferenciar *in vitro* de forma dirigida en las condiciones apropiadas.
7) Pueden dar lugar a cualquier célula del cuerpo adulto, incluso las células germinales, cuando colonizan un blastocisto huésped.
8) Tienen la capacidad de colonizar líneas germinales dando lugar a óvulos y espermatozoides y expresar el factor Oct-4.

Aunque todos estos requisitos son necesarios para definir con precisión el carácter troncal de una ESC, los elementos esenciales se pueden reducir a dos: que las ESC se puedan cultivar *in vitro* y que se puedan expandir de forma indefinida *in vitro* manteniendo el carácter indiferenciado característico de las células de las que se derivaron (Figura 1).

LIMITACIONES EN EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Los estudios sobre células madre constituyen hoy en día uno de los temas más controvertidos en el campo de las ciencias biomédicas. Por una parte han logrado motivar a la comunidad científica, y además han trascendido hasta el ámbito social, convirtiéndose en un objeto de atención generalizada. El alcance mediático de este tipo de investigaciones ha acaparado prensa, radio, televisión, e internet, aunque en muchas ocasiones la espectacularidad de las noticias ha abierto expectativas infundadas y en otras los planteamientos ideológicos han oscurecido la realidad de los logros.

Existen múltiples problemas conocidos que impiden prever qué enfermedades se beneficiarían de un posible uso de tejidos celulares derivados de las hESCs.

En primer lugar, la derivación de hESCs tiene un grado de eficacia muy bajo, siendo necesarios un gran número de embriones para poder conseguir líneas estables. De ahí que los últimos experimentos con este tipo de células estén encaminados al aumento de la eficacia en la derivación de dichas hESCs, teniendo en cuenta factores como la calidad del blastocisto, el método de derivación utilizado, e incluso la superficie de crecimiento utilizada (Cortes et al., 2009).

En segundo lugar, las hESCs forman teratomas al ser implantadas en estado indiferenciado en animales de laboratorio. Este problema desaparece si se implantan después de su diferenciación total, por lo que cualquier protocolo de transferencia de hESCs deberá incluir una diferenciación en su totalidad hacia el linaje de interés. Es importante resaltar que la existencia de hESCs indiferenciadas residuales promoverá la aparición de teratomas (Cortes et al., 2009).

Un tercer problema para la aplicación terapéutica de las hESCs reside en la dificultad de obtener células diferenciadas a un linaje celular puro. Cuando se estimula su diferenciación, las hESCs son capaces de originar cualquier tipo celular, pero raramente lo hacen de manera homogénea y reproducible, sino que dan lugar a poblaciones de células en las que se mezclan distintos tipos especializados (Odorico et al., 2001; Wobus et al., 2001). Gracias a experimentos en células en cultivo y a modelos animales, hoy conocemos genes de diferenciación que controlan las vías de diferenciación. Por ejemplo, existen genes miogénicos que determinan la diferenciación hacia músculo (ej. Myo-D), neurogénicos que inducen la diferenciación hacia neuronas (ej. Sox-1), genes que determinan los distintos tipos celulares pancreáticos (ej. Pax4), etc. La activación controlada de genes de diferenciación en las hESCs podría producir el tipo celular deseado para cada aplicación (Wobus et al., 2001). El cuarto problema sería que las células implantadas podrían sufrir el mismo tipo de rechazo alogénico que se produce en el transplante de órganos (Menendez et al., 2005). Para evitar esto, desde la primera derivación de hESCs en 1998, a fecha de hoy se han derivado más de 300 líneas hESCs en el mundo. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la variabilidad genética de éstas no es muy alta (Mosher et al., 2010), limitando su posible uso en humanos por problemas de rechazo.

Teniendo en cuenta todas estas limitaciones, debido a su poder mediático y en Medicina Regenerativa, actualmente hay en curso al menos dos ensayos clínicos en EEUU que utilizan células derivadas de hESCs para curar enfermedades como la Distrofia Macular de Stargardt's o la parálisis de columna (http://stemcells.nih.gov/info/health.asp). En estos ensayos clínicos, será necesario comprobar que se trata de células funcionalmente activas, de manera que además de estudios de fenotipado y genotipado, será necesario realizar estudios de funcionalidad de estas células, ya que muchas de ellas pueden mantener cierto grado de inmadurez. Por otro lado, será necesario contar con la seguridad de que no quedan células indiferenciadas que, transferidas a un paciente, pudieran provocar teratomas (tumores germinales). Para esto ya se han realizado experimentos mediante la transfección de genes bajo el control de promotores específicos de hESCs y sensibles a antibióticos, de

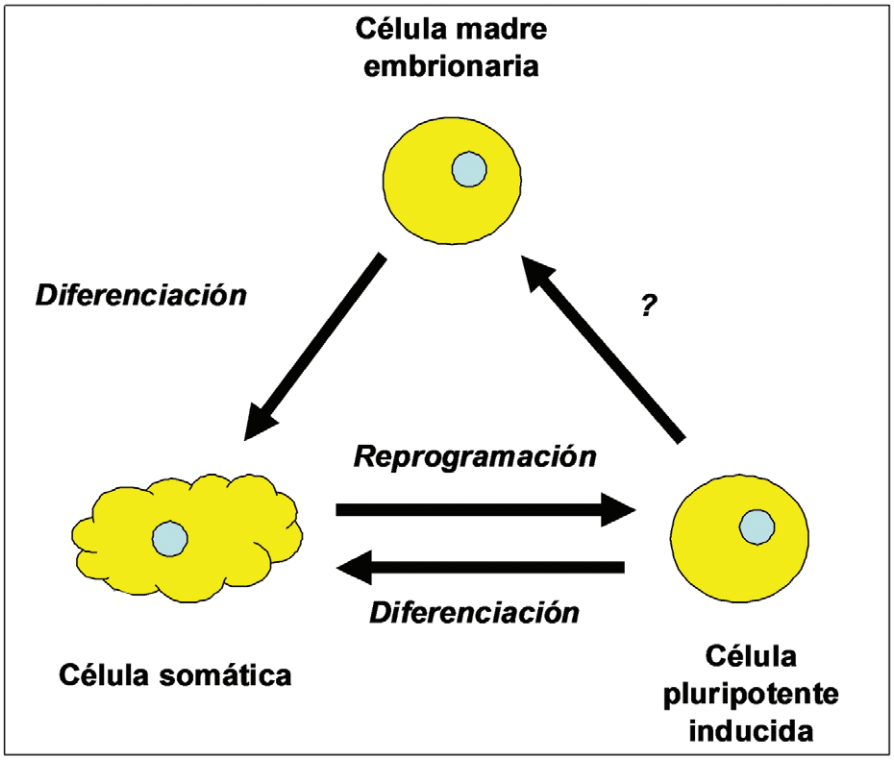


Figura 4: *Comportamiento de una célula madre embrionaria tras diferenciación a célula somática y posibilidad de reprogramarse a célula pluripotente inducida, así como transdiferenciación posterior de estas células a otros tipos de células somáticas (Imagen tomada del BACM).*

tal manera que, en presencia de éstos, las hESCs indiferenciadas residuales desaparecen (Schuldiner et al., 2003). También la separación celular se podría utilizar como una herramienta válida, aunque previamente sería necesario encontrar anticuerpos de membrana celular específicos para el tipo celular que queramos seleccionar.

Pero quizás, los aspectos que más afectan a las investigaciones con hESCs son los éticos y morales, debido a los sectores de la sociedad que no están de acuerdo con la destrucción de los embriones para utilizarlos en investigación. Este hecho hace que sea necesaria una gran regulación legislativa, no sólo a nivel nacional, sino a nivel europeo.

En España, actualmente, la Ley 14/2006, sobre técnicas de reproducción asistida, el Real Decreto 1301/2006, sobre células y tejidos humanos, y la Ley 14/2007, de investigación biomédica, constituyen la norma fundamental del ordenamiento jurídico en este ámbito de la asistencia y la investigación.

Del Instituto de Salud Carlos III depende la Comisión de Seguimiento y Control de donación y utilización de células y tejidos humanos. En particular, le corresponde la emisión del informe relativo a los proyectos de investigación relacionados con la obtención, desarrollo y utilización de hESCs.

A nivel Europeo, se ha publicado la Directiva 2004/23/CE, de 31 de marzo, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Esta Directiva se creó con la intención de unificar la diversidad de estándares presentes en los distintos países de la Unión Europea respecto a la importación/exportación de células y tejidos, la necesidad de incrementar la disponibilidad de células y tejidos donados y la efectividad de usarlos, así como eliminar los errores creados con unos sistemas de codificación y clasificación distintos entre centros y países europeos. En esta Directiva se engloban la mayoría de los tejidos y células humanas, las células reproductoras, tejidos fetales, así como las células madre adultas humanas (hASCs) y hESCs. En los primeros borradores de la Directiva se proponían unos requisitos de calidad importantes, sobre todo con respecto a la calidad del aire tipo A de las salas donde se iban a manipular estos tejidos y células (salas GMP, siglas inglesas de *Good Manufacturing Practice*).

Debido a este punto, esta Directiva ha sido criticada por expertos en reproducción que declaran que las unidades de FIV no necesitan de tantas exigencias para poder realizar su trabajo, aunque de alguna manera no deja de ser una crítica pragmática, ya que parece encaminada a razones financieras y políticas (Mortimer, 2005). Si las clínicas de FIV tuvieran que ceñirse a tales exigencias, la inversión necesaria para adecuar los laboratorios a la nueva Directiva sería insostenible en la mayoría de los casos, llevando a la clínica al cese de sus actividades o encareciendo exhaustivamente los ciclos de FIV. Debido a estas críticas, la Unión Europea ha publicado la Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos. En esta Directiva se matiza sobre la distinción entre laboratorios de reproducción asistida y laboratorios donde se derivan hESCs a partir de embriones humanos, siendo las propuestas menos exigentes con los primeros en lo referente a la calidad del aire (Cortes y Menendez, 2009).

Conjuntamente con la legislación europea, existen iniciativas europeas importantes, financiadas parcialmente por el 7º Programa MARCO de la Comisión Europea, donde se busca dar transparencia a las hESCs respecto a las condiciones de almacenamiento y caracterización (*hESC Registry, Internacional Stem Cell Initiative, Stem Cell Banking Initiative*).

CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS

En el año 2006, el grupo japonés de Shinya Yamanaka demostraba en ratón que la simple introducción de cuatro genes en células somáticas diferenciadas eran capaces de revertir todo el programa de diferenciación y reprogramar las células a un estadio embrionario (Takahashi y Yamanaka, 2006) (Figura 3B, 4). Estas células, denominadas iPSCs (por *induced pluripotent stem cells*), demostraron

Rev Asoc Est Biol Rep Junio 2011 Vol. 16 Nº 1

su capacidad real como célula madre en experimentos de transferencia de blastocistos en ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006). Dados los resultados de este estudio, estos descubrimientos tuvieron una importante repercusión mediática, y la producción de iPSCs fue considerada como el hallazgo más importante de la década por la prestigiosa revista Norteamericana *Science*. Quizás lo más importante en lo que refiere a Medicina Regenerativa, es que la metodología desarrollada por el grupo de Yamanaka fue utilizada por su grupo y otros para generar líneas iPSCs humanas (Lister et al., 2011). Por tanto, la generación de iPSCs a partir de células somáticas ofrece un inmenso potencial terapéutico, así como una herramienta para el estudio de enfermedades, desarrollo embrionario, *screening* de fármacos, etc.

Es importante señalar que el proceso de reprogramación por el cual una célula somática adquiere la pluripotencialidad no es una transformación genética, sino que consiste en una transformación epigenómica (Lister et al., 2011).

Como hemos dicho anteriormente, el origen de las iPSCs consiste en la introducción de cuatro genes en células somáticas. Los métodos más utilizados para ello son:

Realización de una transformación retroviral con los genes OCT-4, SOX2, KLF4 y MYC (Daley et al., 2009)

Realización de una integración lentiviral de los genes OCT-4, SOX2, NANOG y LIN28A (Yu et al., 2007).

Reprogramación sin la utilización de vectores episomales integrados. (Yu et al., 2009).

Actualmente, aunque la reprogramación puede ser inducida por los genes antes enumerados, constantemente están saliendo nuevos genes, como ESRRB y NR5A2, que realizando entre todos ellos combinaciones alternativas consiguen el establecimiento de nuevas iPSCs (Ichida et al., 2009). De igual forma, diversos tipos celulares han demostrado ser útiles en la reprogramación a iPSCs (fibroblastos, queratinocitos, celulas de la sangre, precursores neuronales, etc.) (Hanna et al., 2010).

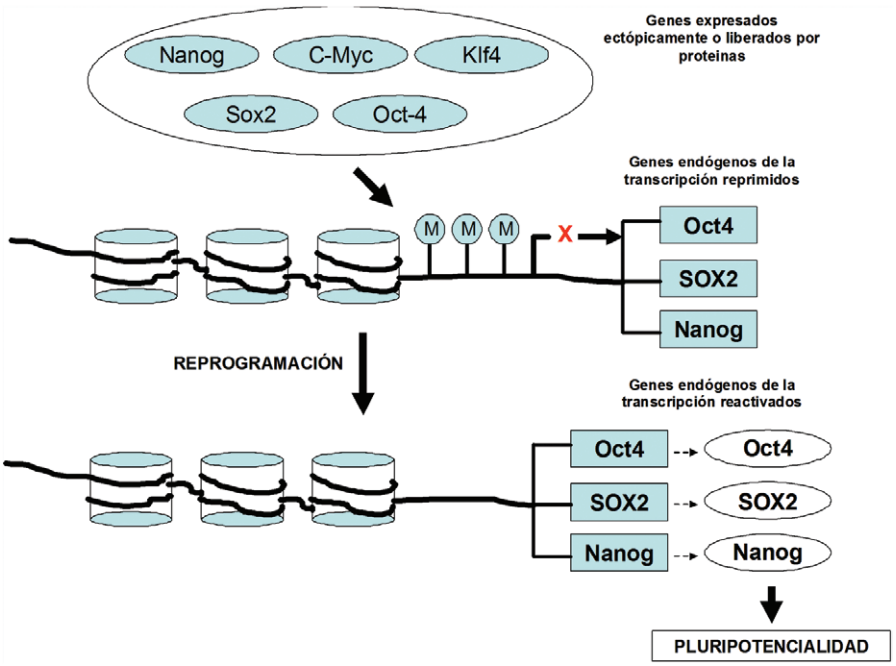


Figura 5: *Esquema de una de las posibles trayectorias de reprogramación epigenética para conseguir la pluripotencia a partir células somáticas (Imagen tomada del BACM).*

Por lo tanto, el proceso de reprogramación de células somáticas está acompañado por la remodelación de marcadores epigenéticos (Figura 5). En las células somáticas, los promotores de los genes antes mencionados están altamente metilados, reflejando su estado transcripcional reprimido. La formación de iPSCs conlleva la activación de estos genes, y su demetilación es usada como control de la reprogramación (Mikkelsen et al., 2008). En principio, la demetilación puede ocurrir mediante un mecanismo pasivo, produciéndose la inhibición de la DNA metiltransferasa 1 durante la replicación de DNA, o puede ocurrir mediante un mecanismo activo, donde la base metilada es reemplazada por DNA no replicativo. Una vez conseguidas las iPSCs, los estudios actuales se centran en las posibilidades de transdiferenciación a los distintos estados somáticos.

Precisamente en estos acontecimientos es donde encontramos las limitaciones de las iPSCs.

LIMITACIONES EN EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS

En primer lugar, la generación de células iPSCs parece anular en gran medida la controversia generada en torno al uso de embriones humanos congelados, dado que no requieren el empleo de ningún material embrionario humano, por lo tanto no se necesitan leyes y regulaciones específicas como es el caso de las hESCs. Además, teóricamente, el origen de líneas iPSCs, a partir de una célula somática de un individuo, facilitaría la aplicación de un transplante autogénico, lo que hasta hace un tiempo se pensaba que sólo era posible utilizando las técnicas de transferencia nuclear, o mediante el empleo de células madre adultas.

Pero, la reprogramación de células somáticas implica la reconfiguración epigenómica, dotando a las iPSCs de características similares, pero parece ser que no idénticas, a las ESCs.

Actualmente, se están publicando trabajos donde se comprueba que existen diferencias, aunque mínimas, en la estructura de la cromatina y expresión de genes entre las hESCs y las iPSCs (Guenther et al., 2010). Por otro lado, se han visto diferencias epigenómicas entre los dos tipos celulares (Kim et al., 2010; Stadfeld et al., 2010), así como alteraciones en el potencial de diferenciación de las iPSCs, comparadas con las ESCs (Hu et al., 2010). Estos descubrimientos indican que existen diferencias fundamentales entre las ESCs y las iPSCs, formulándonos la pregunta de si realmente con las iPSCs se ha vuelto a caer en el error de lanzar grandes expectativas antes de tiempo, al igual que ocurrió a mediados de la pasada década con las ESCs (Hanna et al., 2010).

Más recientemente se han publicado varios artículos donde se demuestra a gran escala que los metilomas de las iPSCs y de las ESCs son muy similares, pero que existe una variabilidad epigenética significativa, y que las iPSCs conservan una "memoria", traducida en diferencias entre las regiones metiladas, y que estas diferencias son transmitidas en alta frecuencia al proceder a la posterior diferenciación de las mismas (Lister et al., 2011). Además, se ha demostrado que durante el proceso de reprogramación se producen alteraciones genéticas, que aunque no muy severas, su repercusión en la funcionalidad de las iPSCs es desconocida (Hussein et al., 2011). Estos últimos descubrimientos han vuelto a dividir a la comunidad científica, formándose dos bandos: los que abogan por afirmar que estas diferencias no son tan importantes, y que merece la pena seguir invirtiendo en el estudio de las iPSCs, y otro bando donde se encuentran los defensores de la investigación con ESCs, con una defensa firme de la completa pluripotencialidad, e invirtiendo su tiempo en el control de la proliferación celular, uno de los factores limitantes para un futuro uso en transplantes.

CONCLUSIONES

Volviendo al ejemplo de la escalera imaginaria de la clase de matemáticas, en la que debemos subir los peldaños uno a uno, pensamos que no es mala la idea de poner un pie en un peldaño, y otro en el siguiente, parándonos el tiempo suficiente y pensando bien cuando avanzar, dando un impulso mayor. De hecho, existen estudios en los que se recomienda la fusión de las células somáticas a reprogramar junto con ESCs, demostrándose una mejora en la reprogramación a iPSCs (Bhutani et al., 2010).

Lo que está claro es que derivar hESCs por aumentar el número de líneas existentes es ya obsoleto, aunque cabe destacar que el proceso de rechazo inmunológico está lejos de ser resuelto, y en teoría un panel extenso de hESCs podría solucionar en parte este problema. Se han establecido el número suficiente de hESCs para poder investigar. Esto no quita que se propongan nuevas estrategias en el método de derivación, cultivo de la colonia primaria sobre nuevos modelos celulares, el establecimiento de hESCs mutagénicas para un amplio abanico de enfermedades, a partir de embriones afectos detectados por diagnóstico genético preimplantacional (DGP), etc. La única pregunta que nos quedaría por contestar es qué podemos hacer con los embriones congelados que sigue habiendo en las clínicas de reproducción, y que ya no son candidatos a ser utilizados para crear nuevas hESCs. Nuestra respuesta es clara, una cosa es investigar utilizando embriones, y otra cosa es estudiar el embrión, y hay todavía muchos aspectos por conocer acerca de la biología del embrión en sí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso-Bedate C. Células troncales embrionarias (ES). Derivación, propiedades y capacidades funcionales. En: Investigación en células madre. Fundación Medicina y Humanidades Médicas. 2004, 23-41.

Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. Nature. 2010; 463: 1042-1047.

Cortes JL, Sanchez L, Ligero G, Gutierrez-Aranda I, Catalina P, Elosua C, et al. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. Human Reproduction. 2009; 24: 1844-1851.

Cortes JL, Menendez P. Reproductive medicine embryologists meet hESC research: need to adjust the regulatory framework to actual expectations about hESC research and its potential detrimental consequences. Fertility & Sterility, 2009; 91:1417-1419.

Daley GQ, Lensch MW, Jaenisch R, Meissner A, Plath K, Yamanaka S. Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. Cell Stem Cell. 2009; 4: 200-201.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292: 154-156.

European Union 2004. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. Official Journal of the European Union. 2004; L 102/48.

European Directive 2006/17/CE, February 8th, implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. 2006; L 38/40.

Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2010; 7: 249-257.

Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. Cell. 2010; 143: 508-525.

Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 4335-4340.

Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. Nature 2011; 471: 58-62.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. Cell Stem Cell. 2009; 5: 491-503.

International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nat Biotechnol. 2007; 25: 803-816.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature. 2010; 467: 285-290.

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

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

Liew CG, Moore H, Ruban L, Shah N, Cosgrove K, Dunne M, et al. Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. Ann Med. 2005; 37: 521-532.

Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature. 2011; 471: 68-73.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium

conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 7634-7638.

Menendez P, Bueno C, Wang L, Bhatia M. Human embryonic stem cells: Potential tool for achieving immunotolerance?. Stem Cell Rev. 2005; 1: 151-158.

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

Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. 2008; 454: 49-55.

Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. RBM online. 2005; 11: 162-176.

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

Mosher JT, Pemberton TJ, Harter K, Wang C, Buzbas EO, Dvorak P, et al. Lack of population diversity in commonly used human embryonic stem-cell lines. N Engl J Med. 2010; 362: 183-185.

National Institute of Health. Stem cells (http://stemcells.nih.gov/info/health.asp)

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 2001; 19: 193-204.

Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. Stem Cells. 2003; 21: 257-265.

Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. Nature. 2010; 465: 175-181.
Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126: 663-676.

Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse blastocysts. Proc Natl Acad Sci USA. 1975; 72: 5099-5102.

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

Wobus AM, Guan K, Pich U. In vitro indiferentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. Methods Mol Biol. 2001; 158: 263-286.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 2007; 318: 1917-1920.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. 2009; 324: 797-801.

REPROGENETICS

COMPROMETIDOS
CON LA
INNOVACIÓN
EN DGP

DIRECTORES CIENTÍFICOS
Mireia Sandalinas - Carles Giménez

ANÁLISIS DE TODOS LOS CROMOSOMAS
MEDIANTE ARRAY CGH (aCGH24)

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

Curso Diploma de Postgrado de Actualización en Técnicas de Reproducción Humana Asistida
http://www.uab.es/postgrau/
http://www.dexeus.com/es_ES/profesionales-02-0.aspx
Inicio Septiembre 2011

XIV Máster de Biología de la Reproducción y Técnicas de Reproducción Humana Asistida
http://www.uab.es/postgrau/
http://www.dexeus.com/es_ES/profesionales-02-0.aspx
Inicio Septiembre 2011

I Simposio Reproducción Asistida Grupo Hospitalario Quirón
"Preservación de la fertilidad en el siglo XXI"
29 y 30 de septiembre de 2011
Hospital Quirón Barcelona

10ª Edición Curso de Especialista Universitario en Biología de la Reproducción Humana
22 de octubre de 2010 hasta 10 de junio de 2011
Universidad Miguel Hernández y la Clínica Vistahermosa
biologia.reproduccion@umh.es

ASEBIR 2011
VI Congreso Girona 2011
5-7 Octubre 2011
Auditori Palau de Congressos
Girona
http://www.vicongresoasebir.es/

ASRM 2011
American Society for Reproductive Medicine
67th Annual Meeting
October 15-19, 2011
Orlando, Florida
http://www.asrm.org/annualmeeting.aspx

I Workshop en Técnicas de Micromanipulacion
Centro de Medicina Embrionaria, Madrid
15 -16 de Noviembre 2011
www.pgdcem.com

IV Workshop de Biopsia: biopsia de corpúsculo polar, blastómero y blastocisto
Centro Medicina Embrionaria, Madrid
17-18 de Noviembre 2011
www.pgdcem.com

29º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fertilidad
Granada
16-18 Mayo 2012
www.sefgranada2012.com

ESHRE 2012
28th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology
1 to 4 July 2012
Istanbul, TURKEY
http://www.eshre.eu/

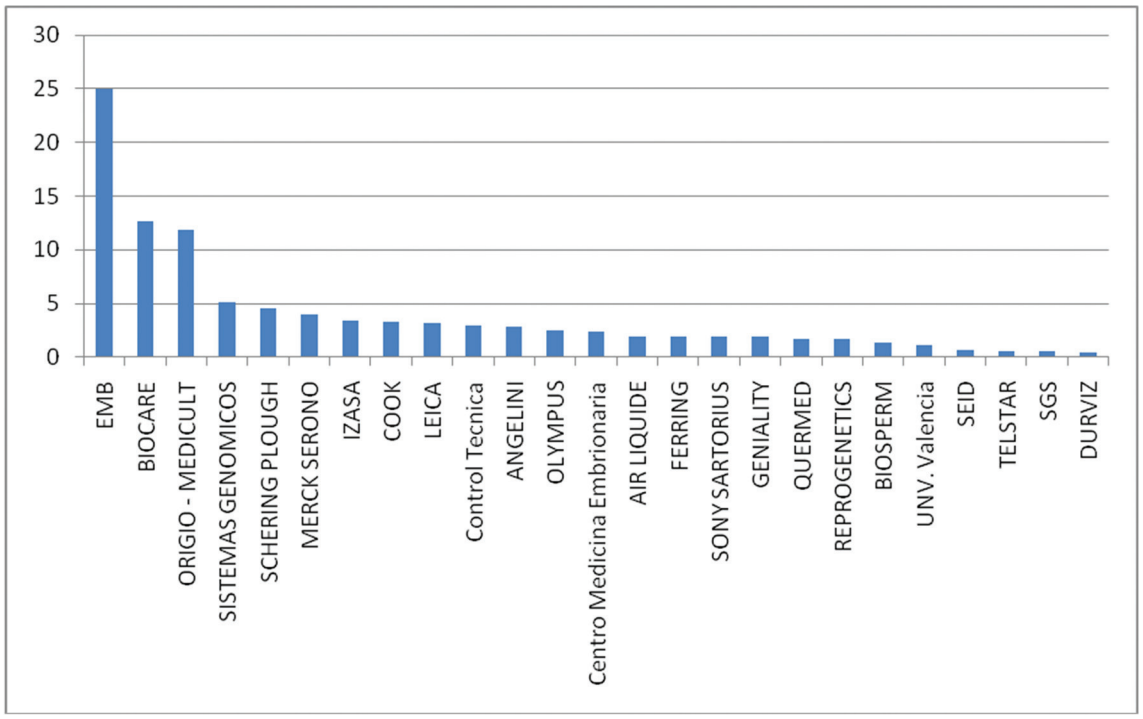
COLABORACIÓN DE LAS CASAS COMERCIALES

Como sabemos, buena parte del trabajo que realizamos desde ASEBIR es gracias a la colaboración económica de las casas comerciales con las que trabajamos en la clínica.

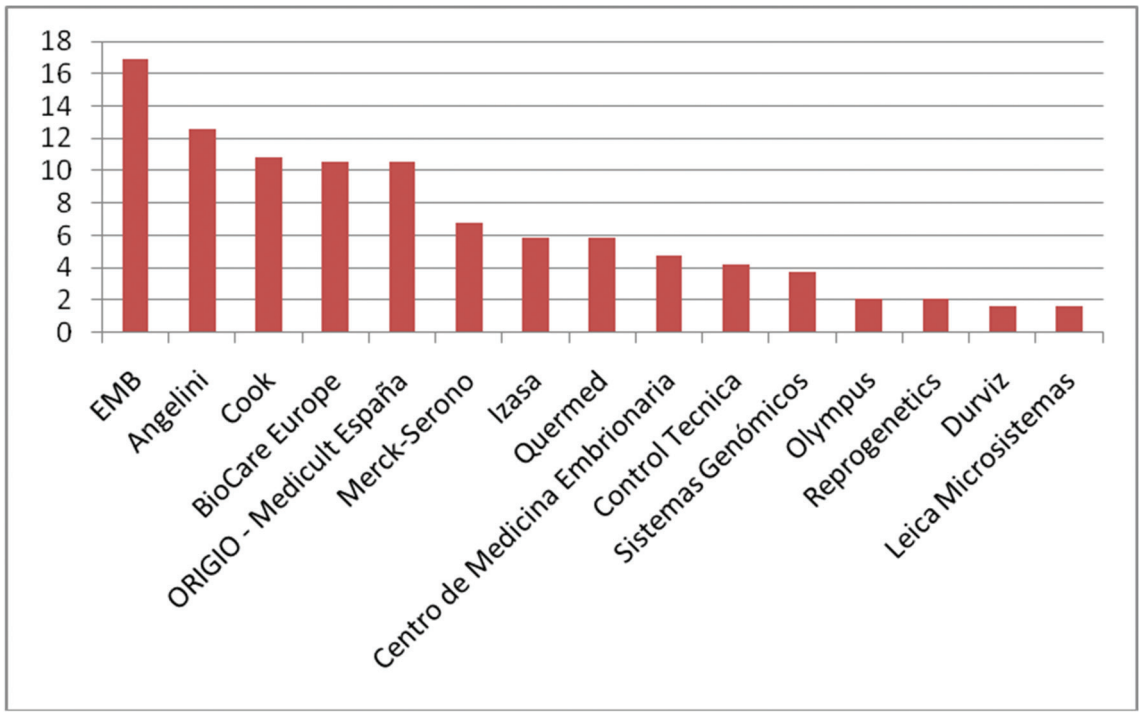
La organización bienal de nuestro Congreso, la organización de nuestros Cursos de Formación, así como la financiación de los Cuadernos de Embriología, es posible gracias al aporte de los Patrocinadores de ASEBIR y demás casas comerciales y laboratorios que colaboran con nosotros, tanto de forma directa como a través de la publicidad en la Revista de ASEBIR y la página Web. Os presentamos en dos gráficos la participación económica de las casas que han colaborado con nosotros durante los años 2009 y 2010.

Y llamamos la atención sobre que, durante este año 2011, en el que celebraremos nuestro VI Congreso ASEBIR en Girona, la colaboración de las casas comerciales y laboratorios continúa con el mismo entusiasmo de años anteriores, lo cual agradecemos sinceramente.

% PATROCINIO AÑO DE CONGRESO (2009)



% PATROCINIO AÑO SIN CONGRESO (2010)



NORMAS DE PUBLICACIÓN

INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES. NORMAS DE PUBLICACIÓN

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

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

• Antes del 31 de Marzo para el primer número del año (Junio)

• Antes del 30 de Septiembre para el segundo número del año (Diciembre).

MANUSCRITOS:

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

Para artículos originales y temas de actualización se sugiere una extensión no superior a las trece hojas DINA4 a 30 líneas, con no más de seis figuras y seis tablas.

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

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

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

Las referencias bibliográficas se presentaran 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 movility 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 movility in patients with idiopathic oligoasthenozoospermia. Andrologia 1985; 17:612-616.

C) LIBRO COMPLETO:

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

D) CAPÍTULO DE LIBRO:

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

E) COMUNICACIÓN A CONGRESO:

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

Para la sección de debate se aceptarán textos (de no más de dos hojas DINA4 a 30 líneas, incluidas un máximo de cinco citas bibliográficas y dos figuras si las hubiere), que reflejen la opinión de los diferentes firmantes sobre el tema de discusión que se propondrá en el número de la revista anterior.

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

ASEBIR

VI CONGRESO GIRONA 2011

5, 6 Y 7 DE OCTUBRE

Auditori Palau de Congressos de Girona

www.vicongresoasebir.es

CRÉDITOS:

Actividad acreditada por el Consejo Catalán de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias – Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud, con 1,4 Créditos, (Actividad de Formación Continuada registrada con el número 09/02940-BQ)

Comisión de Formación Continuada
SISTEMA NACIONAL DE SALUD
Comisión de Formación Continuada de las Profesiones Sanitarias

Consell Català de Formació Continuada Professions Sanitàries

AUSPICIADO POR:

ASESA
ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ANDROLOGÍA, MEDICINA SEXUAL Y REPRODUCTIVA

AVALADO
Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

SEQC

Sociedad Española de Fertilidad

SECRETARÍA TÉCNICA:

Grupo Process · Betaprocess, S.L.

C/ Cronos, 20, Bloque 4, 1°, 6ª - Madrid 28037 · Telf.: +34 91 377 14 23 / Fax: +34 91 377 49 65 · E-mail: VIcongreso@asebir.com

ASEBIR

VI CONGRESO GIRONA 2011

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ASEBIR

asebir@asebir.com | www.asebir.com