

REVISTA

# ASEBIR



## ACTUALIDAD

Embriones humanos criopreservados: traslado entre centros de reproducción asistida

## AULA JOVEN

Lavado seminal en varones seropositivos para el VIH. ¿Está todo resuelto?

## ARTÍCULO I

Desequilibrios cromosómicos en espermatozoides de individuos portadores de translocaciones recíprocas

## ARTÍCULO II

Patrón de movilización del  $[Ca^{2+}]_i$ , apoptosis y papel de la actina en pacientes astenozoospermicos

## FORMACIÓN CONTINUADA

Medios de cultivo para fecundación in vitro: ¿qué les falta para ser perfectos?

## GRUPOS DE INTERÉS: GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

IV Recogida de datos de DGP en España: 1 de enero del 2008 a 31 de diciembre de 2009

## CONTROL DE CALIDAD EXTERNO DEL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

*Parámetros sometidos a examen: Casos virtuales de pacientes con embriones  
D+2 a D+5 en los que se evaluará:*

- Características morfológicas
- Clasificación y decisión clínica

*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

### 15 DE JULIO DE 2012

<http://controldecalidad.asebir.com/>

*Con la colaboración de:*

**Ceifer**

### SUMARIO

### Pág.

#### EDITORIAL

Adiós a Lynette A. Scott  
Montse Boada

3

#### ACTUALIDAD

Embriones humanos criopreservados:  
Traslado entre centros de reproducción asistida  
Mark Grossmann i Camps,  
María Victoria Hurtado de Mendoza Acosta,  
Montse Boada i Palà, Maria Carme Pons Gatell

5

#### ARTÍCULOS

Desequilibrios cromosómicos en espermatozoides de individuos  
portadores de translocaciones recíprocas  
Anna Godo, Francesca Vidal, Joan Blanco, Ester Anton

12

Patrón de movilización del  $[Ca^{2+}]_i$ , apoptosis y papel de la actina  
en pacientes astenozoospermicos  
Graciela M. Lozano, Águeda Ortiz, Fabián Monllor, M<sup>a</sup> Isabel Jiménez,  
Juan Francisco García

#### AULA JOVEN

Lavado seminal en varones seropositivos para el VIH ¿está todo  
resuelto?  
M<sup>a</sup> Carmen Galbis, José Remohí, Antonio Pellicer, Nicolás Garrido

28

#### DEBATE

#### FORMACIÓN CONTINUADA

Medios de cultivo para fecundación *in vitro*:  
¿Qué les falta para ser perfectos?  
Pilar Coy

40

44

#### GRUPOS DE INTERÉS: GENÉTICA Y REPRODUCCIÓN

IV Recogida de datos de DGP en España: 1 de enero del 2008  
a 31 de diciembre de 2009  
Esther Velilla, Silvia Fernández, Mònica Parriego, Mireia Sandalinas

54

#### AGENDA

61

#### NOTICIAS

62

#### INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES

63

Junio 2012 Vol. 17 N°1

#### EDITA

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

#### EDITORES Y DIRECTORES CIENTÍFICOS

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dr. Jorge Cuadros Fernández  
CLÍNICA FIVMADRID, Madrid

#### COMITÉ EDITORIAL

##### Presidente:

Dr. Manuel Ardoy Vilches  
HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN - Madrid

##### Vicepresidenta Responsable Certificación ASEBIR y Delegados Autonómicos:

Dra. Carmen Ochoa Marieta  
CER. CLINICA COTERO - Santander

##### Secretaría, Publicaciones:

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS - Barcelona

##### Tesorería y Relaciones con la Industria:

Dr. Fernando Marina Rugero  
INSTITUTO DE REPRODUCCION CEFER - Barcelona

##### Vocalía de Grupos de Interés, Investigación y Certificación ASEBIR:

Dr. Josep Santaló Pedro  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA - Bellaterra

##### Vocalía de Congresos y Certificación ASEBIR:

Dra. Yolanda Mínguez Royo  
IVI MADRID - Madrid

##### Vocalía de Docencia y Formación Continuada:

Dra. M<sup>a</sup> José Torello Ybañez  
HOSPITAL QUIRÓN, Barcelona  
Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel  
INST. EXTREMEÑO REPRODUCCIÓN ASISTIDA -IERA -Badajoz

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA, Alicante

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

##### Vocalía Página Web:

Dr. Juan Manuel Moreno García  
CLINICA VISTAHERMOSA - Alicante

##### Vocalía de Publicaciones:

Dr. Jorge Martín Cuadros Fernández  
CLÍNICA FIV-MADRID, Madrid

Dra. Marga Esbert Algam  
IVI BARCELONA, Barcelona

Dra. Montserrat Boada Palá  
INSTITUT UNIVERSITARI DEXEUS, Barcelona

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

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

#### PUBLICIDAD Y COLABORACIONES

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

#### DISEÑO, MAQUETACIÓN E IMPRESIÓN

GÓBALO: Gráfica · Web · Multimedia · Consultoría  
C/ Castillo de Fuensaldaña 4, Oficina 213 | 28232 · Las Rozas · Madrid  
Tfno - Fax.: 91 626 39 74 | www.gobalo.es · info@gobalo.es  
Depósito legal: M-18873-1996 | ISSN: 1136-4424 | Soporte válido: 78-R-CM

# Introducing **Continuous Single Culture™ (CSC™)**

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

## **One Step One Choice**

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



\*Data on file - Shady Grove Fertility Center

\*Pending CE Mark

For more information on all our reproductive products visit [www.irvinesci.com](http://www.irvinesci.com) or call 1-800-437-5706



## ADIÓS A LYNETTE A. SCOTT



Lynette Scott, doctora en Biología del Desarrollo y embrióloga clínica de reconocido prestigio mundial, fue directora del laboratorio de reproducción asistida del Fertility Center de New England en Massachusetts. A lo largo de su trayectoria profesional, contribuyó enormemente al desarrollo de nuestra profesión centrandose su interés en el estudio de parámetros morfológicos para la valoración de la viabilidad embrionaria. Publicó numerosos artículos entre los que destacan los relacionados con la valoración pronuclear y la valoración embrionaria secuencial que han sido de gran valor para sentar las bases de la embriología clínica actual. Su visión avanzada hizo que la idea, hoy por hoy incuestionable, de valorar los embriones secuencialmente para seleccionar los de mejor pronóstico se difundiera y empezara a tomar forma hace ya más de una década.

L.Scott colaboró activamente con distintas sociedades científicas no solo americanas sino también europeas como ESHRE y ALPHA. Su reciente participación en la conferencia de Consenso de Estambul sobre valoración embrionaria es una muestra de ello. En el congreso de ASEBIR de Valencia 2009 tuvimos la oportunidad de poder contar también con su presencia ofreciéndonos la ponencia "*Oocyte and embryo oxygen consumption. Can it tell us anything about developmental potential?*" Ahora, después de su inesperado fallecimiento el pasado 2 de febrero de 2012, valoramos enormemente la suerte que tuvimos de poder contar con su presencia y compartir sus experiencias en nuestro congreso de ASEBIR.

En agradecimiento a su trabajo y dedicación, desde la junta directiva de ASEBIR y en representación de la comunidad que constituimos todos los miembros de nuestra sociedad queremos expresar nuestro respeto y reconocimiento por la labor que L. Scott ha realizado en beneficio de la ciencia en general y, muy especialmente, de la Embriología Clínica.

Hasta siempre Lynette.

Montse Boada  
Secretaria de la Junta Directiva de ASEBIR

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



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



**IVFtech**  
**SANYO**

**KITAZATO**  
**RI**



  
**Rocketmedical**  
**nunc**<sup>™</sup>



**BioCare**  
E u r o p e



Somebody is waiting for  
good news

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.biocareurope.com](http://www.biocareurope.com)

## EMBRIONES HUMANOS CRIOPRESERVADOS: TRASLADO ENTRE CENTROS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

### HUMAN CRYOPRESERVED EMBRYOS: TRANSPORTATION BETWEEN CENTRES OF ASSISTED REPRODUCTION

Mark Grossmann i Camps<sup>1</sup>, María Victoria Hurtado de Mendoza Acosta<sup>2</sup>, Montse Boada i Palà<sup>3</sup> y Maria Carme Pons Gatell<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Reproducció Assistida de Centro Médico Teknon, Barcelona. <sup>2</sup>MasVida Reproducció, Sevilla. <sup>3</sup>Servei de Medicina de la Reproducció del Institut Universitari Dexeus, Barcelona.

e-mail: mgrossmann@cmtekon.com

#### RESUMEN

Todos los embriones deben tener su proyecto reproductivo, lo que significa que una mujer o pareja son responsables del destino de sus embriones criopreservados y pueden solicitar el cambio de centro de custodia aunque no dispongamos de un único protocolo consensuado de actuación para los traslados. Este trabajo busca sopesar los distintos aspectos del traslado entre centros de los embriones humanos criopreservados.

Palabras clave: traslado / embriones criopreservados humanos / protocolos

#### SUMMARY

Embryos must have their reproductive project, which means that a woman or a couple are responsible for the fate of their cryopreserved embryos and they may apply for transferring embryos from one centre to another, although we do not have a single Protocol Act in order to transfer embryos between centres. This work seeks to weigh up aspects of the transportation of cryopreserved human embryos between centres.

Keywords: transportation / human cryopreserved embryos / guidelines

#### INTRODUCCIÓN

Todos conocemos que los embriones humanos pueden ser criopreservados en distintos momentos de su desarrollo preimplantatorio *in vitro* (zigotos, células o blastocisto) y usando distintos protocolos (por ejemplo congelación lenta con 1,2-propanodiol o con glicerol; o vitrificación). Los resultados del proceso de criopreservación, no sólo dependen del estadio de desarrollo y del protocolo escogido, sino también de la calidad de los embriones y de la experiencia de los embriólogos.

En este sentido, los centros de reproducción humana asistida (RHA), gracias a la mejora en los equipamientos, en las condiciones de cultivo y en los conocimientos y formación de los embriólogos, hoy en día consiguen un muy buen desarrollo embrionario preimplantacional, lo cual permite reducir el número de embriones a transferir y disponer de embriones "sobrantes" de muy buena calidad.

Los últimos datos conocidos del registro español de actividad, que no es un registro obligatorio, muestra para el año 2009 un total de 10.248 criotransferencias con una tasa de embarazo del 32% por transferencia. Según los datos comunicados, las gestaciones a partir de embriones criopreservados representaron un 17% de las gestaciones registradas (SEF, 2009). Otros autores refieren proporciones mayores de hasta un 25% de gestaciones conseguidas a partir de criotransferencias (Capalbo et al., 2011).

Conforme a la legislación española vigente los embriones que no se transfieran y se consideren aptos deben criopreservarse ya que no pueden destruirse fuera de los supuestos legalmente autorizados.

En otras ocasiones, por ejemplo cuando no se realiza la transferencia en un ciclo de donación de ovocitos (donación asincrónica) o cuando se dispone de un elevado número de embriones pero

existe riesgo de hiperestimulación ovárica, los centros de RHA deben criopreservar todos los embriones obtenidos en espera del momento óptimo para realizar la transferencia embrionaria.

Los embriones quedan bajo la custodia de los centros de RHA porque son las únicas instalaciones capaces de garantizar su continuidad en las estrictas condiciones requeridas para su correcta conservación pero forman parte de un proyecto reproductivo y son responsabilidad de la mujer o la pareja.

Legalmente en España, este almacenamiento *se podrá prolongar hasta el momento en que se considere por los responsables médicos, con el dictamen favorable de especialistas independientes y ajenos al centro correspondiente, que la receptora no reúne los requisitos clínicamente adecuados para la práctica de la técnica de reproducción asistida* (Ley 14/2006), o lo que se ha venido denominando *la vida fértil de la mujer* y que representa un

período muy largo, que generalmente se considera que finaliza cuando la mujer alcanza los 50 años de edad.

Algunas veces, por los motivos que sean, los pacientes deciden trasladar sus embriones a otro centro distinto de aquel que los criopreservó y los conserva. En un reciente estudio belga sobre el destino que se da a los embriones criopreservados, Provoost y colaboradores (2012) publican que, tras 15 años de actividad, sólo en 4 casos sobre 2931 (0,1%) se solicitó el traslado de los embriones desde un centro a otro.

De acuerdo a nuestra propia experiencia, y aunque en los últimos años las solicitudes de traslado de embriones a otros centros han experimentado un ligero aumento, las peticiones siguen siendo poco frecuentes y su práctica no es muy habitual.

Quizás por ello, cómo llevar a cabo todos los pasos del proceso de traslado puede ser motivo de confusión ya que no disponemos de un único protocolo de actuación consensuado ¿Dónde empiezan y acaban las responsabilidades del centro que custodia los embriones, del que los recibe o de quién efectúe el traslado? ¿Qué documentación sería necesaria?

Este trabajo busca sopesar los distintos aspectos del traslado de los embriones humanos y comentarlos desde la óptica de distintos centros.

## MARCO LEGAL

De cara a organizar un traslado de embriones entre centros, deberíamos tener en cuenta los siguientes requisitos de la legislación española:

- Todos los embriones deben tener su proyecto reproductivo lo que significa que una mujer o una pareja son responsables del destino de sus embriones (Ley 14/2006).
- El centro receptor debe estar autorizado por las autoridades sanitarias correspondientes (Real Decreto 413/1996 y normativas de las distintas CCAA). Obviamente, se

sobreentiende que el centro donde se tienen los embriones ya está autorizado.

- Para mantener la debida protección de datos de carácter personal, la mujer o la pareja deberían autorizar la transferencia entre centros de información personal (información parcial de la Historia Clínica, HC) y de información relativa a los embriones criopreservados (información parcial de los registros del laboratorio). Además, según el Real Decreto 1301/2006, el centro emisor debe identificarse y etiquetar tanto el contenedor primario como el contenedor externo (ver apartado 5 de este artículo).
- Además, el centro de salida debe adoptar las medidas para que la información de carácter personal quede protegida durante el traslado si éste lo realizan terceras partes (Ley 15/1999).
- El centro receptor debe identificarse y emitir acuse de recepción para completar la trazabilidad a la que ambos centros están obligados (Real Decreto 1301/2006).

Por trazabilidad se entiende, según la definición dada en el Artículo 2.1 X) de ese Real Decreto, *la capacidad para ubicar, localizar e identificar las células y/o tejidos en cualquier paso del proceso desde la donación, la obtención, el procesamiento, la evaluación, el almacenamiento y la distribución hasta llegar al receptor o hasta ser desestimados y/o destruidos, o que lleva consigo la capacidad de identificar al donante, el establecimiento de tejidos y la instalación que recibe, procesa o almacena los tejidos o células, así como la capacidad de identificar al receptor o receptores en los que se apliquen los tejidos o células. La trazabilidad cubre, asimismo, la capacidad de localizar e identificar cualquier dato relevante de los productos y materiales que van a estar en contacto directo con las células y/o tejidos y que puedan afectar a la calidad y seguridad de los mismos.*

- Además, de las consultas tramitadas en la asesoría jurídica de ASEBIR se deduce que la mujer o la pareja están en su derecho de solicitar el traslado de sus embriones y que no se les puede negar ese traslado, ya que ellos son los responsables y el centro es el depositario (ASEBIR 2012).

## PROCEDIMIENTO PASO A PASO

### 1 ¿Quién notifica al centro donde están los embriones criopreservados, el traslado de los mismos?

Siempre los pacientes, nunca el centro receptor. Conforme a la confidencialidad exigible en nuestras actuaciones, no deberían atenderse consultas (telefónicas o vía correo electrónico) sobre el número de embriones, el estadio, el protocolo de criopreservación etc. de un centro de RHA que nos diga que unos determinados pacientes desean un traslado de embriones.

Es la mujer o la pareja la que, por escrito, deben comunicar al centro donde tiene sus embriones que desean efectuar un traslado. En esa comunicación debería notificarse el centro de destino que recibirá los embriones, y para cumplir con la ley de autonomía del paciente y con la LOPD, se recomienda que los pacientes firmen una autorización para la entrega, al centro de destino, de sus datos personales, también la de los datos de laboratorio relacionados con la criopreservación de sus embriones, así como una autorización para comentar, entre profesionales de cada centro, los detalles del caso si fuese preciso.

### 2 Una vez comunicado el deseo de traslado ¿quién lleva la iniciativa?

El centro que recibe los embriones debe llevar la iniciativa porque, en definitiva, es el centro que tiene interés en el traslado. En este contexto "llevar la iniciativa" significa organizar el traslado de los embriones de forma adecuada y guiar a los pacientes sobre los pasos del proceso. En el caso de los traslados hacia centros situados fuera de España, entendemos que también es el centro receptor quien asesorará y gestionará el proceso.

### 3 Tipo de contenedor y quién lo aporta

Es el centro que recibe los embriones el que, *a priori*, debe aportar el contenedor adecuado para el traslado.

El depósito más apropiado es la bombona "en seco", aquella cuyas paredes absorben el N<sub>2</sub>L y evitan los derrames al tiempo que mantienen las condiciones adecuadas de frío. La mayoría de casas comerciales especializadas tiene en catálogo contenedores que cumplen la reglamentación internacional aplicable al transporte de mercancías peligrosas por carretera (ADR), por vía aérea (IATA) o ferroviaria (RID) y cada centro debe conocer cuál es la autonomía de sus bombonas de traslado (ver las especificaciones de cada fabricante).

Consideramos que el centro receptor es el que debería proveer el contenedor de traslado no solo porque es el que tiene mayor interés en llevar a cabo el traslado sino por otras dos razones. De un lado, porque recupera el contenedor al final del trayecto, pero además también porque, tratándose de su contenedor, conoce su estado de conservación y limpieza. Téngase en cuenta que las especificaciones sobre cómo limpiar los contenedores de transporte (Castilla y Magán, 2003), pueden variar según cada tipo de contenedor no existiendo un protocolo único de manera que cada centro debería responsabilizarse de mantener en buenas condiciones sus propios recipientes.

Alternativamente, las empresas especializadas en el transporte de material biológico disponen de contenedores adecuados, tanto del recipiente primario como del contenedor secundario de protección.

El centro emisor, que es quien tiene la custodia de los embriones, puede retrasar la entrega o negarse a hacerla si considera que las condiciones para el transporte no son las apropiadas, por ejemplo si se recibe un contenedor sin la temperatura adecuada o sin N<sub>2</sub>L. El centro emisor debería asegurarse que el contenedor que recibe está suficientemente frío antes de introducir las pajuelas. Así se garantizará la máxima duración posible de las

condiciones de mantenimiento frente a imprevistos. Esto es particularmente necesario en los trasportes de larga distancia.

### 4 ¿Quién transporta los embriones?

Éste es un punto de debate recurrente cuando se plantea un traslado ¿pueden los propios pacientes realizar ese traslado? Ésta es la opción fácil si no tenemos en cuenta el alto grado de exigencias que se contempla en el Real Decreto 1301/2006 para realizar el transporte del material biológico que nos obliga a garantizar en todo momento su trazabilidad, también incluida en dicha norma, y si no tenemos en cuenta los riesgos de manipular contenedores que contengan N<sub>2</sub>L sin las debidas precauciones. Pero si atendemos a la responsabilidad del centro para con los embriones se ve claramente que éstos sólo pueden entregarse a personal especializado. En esta misma línea se manifestó la Asesoría Jurídica de ASEBIR cuando se le planteó la cuestión de quién debía realizar el transporte: *la conclusión no puede ser otra que la de descartar que el transporte de embriones congelados pueda realizarse por los propios pacientes o por alguien no profesional (ASEBIR 2012).*

Y por personal especializado se entiende personal de los propios centros de RHA que acompañan el contenedor o bien transportistas especializados.

La primera opción sería la mejor, al menos en traslados de corta distancia... la segunda, con servicio puerta a puerta, sería la elegible entre ciudades distantes.

Evidentemente el centro receptor debe identificar la empresa transportista con la suficiente antelación e incluso algunos centros de RHA piden la identificación previa de la persona física que recogerá el contenedor, de cara a trasladar custodias.

### 5 Documentación que acompaña el traslado de los embriones

Sin lugar a dudas el traslado de embriones criopreservados debe quedar exhaustivamente documentado.

El centro emisor, junto con los embriones debe incluir un documento que vincule el código de identificación de las pajuelas con la mujer o la pareja, y en el que también se detalle el número de embriones criopreservados entregados, el estadio de desarrollo y la calidad, la fecha de criopreservación y el protocolo utilizado. También debe indicarse el origen de los gametos (propios o de donante), las serologías y un resumen de la HC por si, al final, esos embriones que se trasladan pasasen a disposición del banco de embriones del centro receptor. Además, sería recomendable que ese documento también incorporase, a modo de recomendación, las instrucciones para la descongelación de los embriones entregados.

Adecuando los requerimientos del Real Decreto 1301/2006 a nuestro material, la información que debería adjuntarse es la siguiente:

*1.º El establecimiento de tejidos debe disponer de un sistema de etiquetado que garantice que las etiquetas o los documentos cumplen con los siguientes requisitos de información:*

*i) El etiquetado del contenedor primario de las células/tejidos debe mostrar:*

- 1) El número de identificación o código del tejido/célula, el tipo de células o tejidos y el lote cuando esto último proceda.*
- 2) La identificación del establecimiento de tejidos.*
- 3) La fecha de caducidad.*
- 4) En el caso de que sea para uso autólogo, esto debe ir especificado: «para uso autólogo». Además, se mostrará el código de identificación del donante/receptor.*
- 5) En el caso de donaciones dirigidas, se identificará el receptor.*
- 6) Cuando se conozca que las células /tejidos son positivos para algún marcador de enfermedad infecciosa, deberán ir identificados como muestras de riesgo: «riesgo biológico».*

Si, por razones de espacio, no es posible incluir la información referida en los puntos 4) y 5), ésta deberá ser facilitada en un documento añadido al contenedor primario. Dicho documento deberá ir embalado junto al contenedor primario de forma que se asegure que permanecen juntos.

ii) La información que se detalla a continuación puede figurar en la etiqueta o bien en un documento adjunto:

- 1) Descripción, definición y, si fuera relevante, las dimensiones del tejido o producto celular.
- 2) Morfología y datos funcionales cuando sea relevante.
- 3) Fecha de distribución de las células / tejidos.
- 4) Determinaciones biológicas que se han llevado a cabo en el donante y sus resultados.
- 5) Recomendaciones de almacenamiento.
- 6) Instrucciones para la apertura del contenedor, para el embalaje y para cualquier manipulación o reconstitución.
- 7) Fechas de caducidad después de la apertura o manipulación del contenedor.
- 8) Instrucciones para la comunicación de efectos o reacciones adversas.
- 9) Presencia de residuos potencialmente peligrosos (antibióticos, óxido de etileno, etc).

iii) Etiquetado externo para el contenedor de envío o transporte.

Para el envío, el contenedor primario debe ir incluido en un contenedor de transporte adecuadamente etiquetado. Esta etiqueta contendrá, al menos, la siguiente información:

- 1) Identificación del establecimiento de tejidos de origen, incluyendo la dirección, el teléfono y la persona de contacto.

2) Identificación del centro de implante de tejidos o establecimiento de tejidos destino, incluyendo la dirección, el teléfono y la persona de contacto.

3) La constatación de que el paquete contiene tejidos o células humanas y que debe ser manejado con cuidado.

4) Si se envían células vivas y el mantenimiento de la viabilidad es básico para el éxito del injerto, como es el caso de los progenitores hematopoyéticos, células precursoras, gametos o células embrionarias, debe añadirse en un lugar bien visible el anuncio de: «NO IRRADIAR».

5) Recomendaciones para las condiciones de transporte (posición, temperatura etc).

6) Instrucciones de seguridad.

7) Métodos de congelación o descongelación o cualquier otra manipulación necesaria cuando ello sea de aplicación.

El centro emisor debe identificar la persona que retira los embriones y conservar en la HC los datos de esta persona. Es recomendable que exista un Documento de entrega-retirada de los embriones criopreservados para su traslado a otro Banco de Embriones autorizado donde se especifica el día y hora en el que son entregados los embriones. En el caso de que vengan los propios pacientes acompañando el transporte, ellos firmarán conforme se exime al centro de cualquier responsabilidad, especialmente referidas al traslado, mantenimiento, proceso de descongelación y sus resultados. En caso de que venga una persona autorizada, ésta traerá una autorización firmada por los pacientes, entregará fotocopia de su DNI y firmará la retirada de los embriones.

Para el transporte debería completarse un formulario de declaración de material biológico y de los riesgos asociados al tipo de transporte. Las empresas especializadas disponen de estas fichas de declaración de productos biológicos. Y si se usa una empresa especializada, ésta debería comunicar por escrito la

correcta entrega de los embriones en destino (fecha y hora de la recepción y persona que recibe los embriones).

Y finalmente, el centro receptor de los embriones debería emitir un acuse de recibo en el que constara el material recibido.

De esta manera, el centro emisor puede documentar los embriones hasta el centro de nuevo destino, mientras que el centro receptor dispone de información suficiente para almacenar los embriones.

## 6 Comprobación del material entregado

En alguna rara ocasión ha sucedido que la persona que va a transportar el contenedor con los embriones solicita revisar el contenido antes de aceptar la custodia. Este es un punto delicado y de difícil resolución. En primer lugar, como profesionales realizando un trabajo altamente especializado y con los mejores estándares de calidad, actuar de buena fe y en beneficio de los pacientes es nuestra obligación, y con ello debería bastar para convencer. Por otro lado, la localización de las pajuelas con los embriones y su traspaso al contenedor de traslado deberían realizarse con un testigo o controller interno, propio del centro emisor, y con ello debería bastar. Si no fuese así, se podría acordar la revisión del contenido en el momento de pasar las pajuelas desde el banco al contenedor, pero ello sólo tendría sentido si la persona que recibe el contenedor es también embriólogo/a. Admitir como controller a una persona ajena no sería recomendable pues puede comportar una alteración innecesaria del orden y estabilidad del laboratorio de RHA.

Normalmente, la comprobación del contenido se llevaría a cabo en el laboratorio del centro receptor y en las condiciones adecuadas. Y es entonces cuando en caso de que se detecte alguna anomalía, éstas deberían consignarse. En ningún caso es aceptable que se abra el contenedor fuera de las áreas de embriología ya que ello pone en riesgo la viabilidad de los embriones trasladados.

Procediendo de esta manera, las pajuelas con los embriones criopreservados sufren únicamente dos momentos de estrés coincidiendo con los dos cambios de contenedor. Aunque parezca innecesario, queremos recordar que esos cambios de ubicación deben realizarse lo más rápidamente posible, sobre todo con los soportes para embriones vitrificados ya que las pajuelas para criopreservación tienen un volumen de 0,3 ml lo que les otorga mayor resistencia a los cambios de temperatura, mientras que los soportes para vitrificación se cargan con sólo 1 o 2 µl.

Si se hacen bien los cambios de ubicación de las pajuelas y si el contenedor de transporte está correctamente enfriado y no hay demora en el transporte, no sería necesario incorporar, dentro del contenedor, un control de temperatura.

## 7 ¿Cómo se traspasa la custodia?

Es importante que la mujer o la pareja entiendan que el traslado de los embriones es un proceso con riesgos asociados y que comporta la transferencia de custodia durante el traslado.

La custodia se transfiere con la entrega de los embriones, es decir, el centro emisor recibe el contenedor y es responsable de los embriones hasta que el contenedor se entrega a la persona que hará el traslado y que firma la recepción del mismo.

Esta persona que realiza el traslado (o en su defecto la empresa para la que trabaja) es responsable de los embriones hasta que entrega el contenedor en el centro de recepción y obtiene la firma de aceptación de los embriones.

A partir de ese momento los embriones quedan bajo la custodia del centro receptor.

## 8 ¿Todos los embriones se trasladan?

De la misma manera que queda claro que un centro de RHA no puede negarse al traslado de unos embriones, parece lógico establecer que, cuando se autorice un traslado, éste incluya

todos los embriones de una misma mujer o una misma pareja a menos que exista una razón de peso para proceder de otra forma. Aceptar particiones aumenta la posibilidad de abandono de los embriones y sólo complica la gestión de los bancos de embriones criopreservados, sin aportar ninguna ventaja a la mujer o la pareja.

## OTRAS CONSIDERACIONES

a) En caso de que los pacientes no puedan acudir al centro emisor (pacientes extranjeros, etc.) deberán enviar el original de consentimiento de traslado debidamente firmado y con fotocopias de sus documentos de identidad. Lo mejor sería concretar la fecha para la recogida cuando se firman los consentimientos ya que, aunque parezca incomprensible, se ha dado el caso de venir a la firma y después transcurrir meses antes de retirar los embriones. Por un lado han firmado que retiran los embriones pero por otro lado no se los llevan, lo que da pie a que los pacientes se desentiendan del tema y el centro quede con la custodia de unos embriones "abandonados".

b) Es importante minimizar el tiempo de traslado y evitar posibles retenciones en aduanas u otras oficinas intermediarias. Aunque los embriones criopreservados pueden trasladarse entre centros de RHA, se trata de material biológico muy sensible a los cambios de temperatura, mucho más en el caso de los embriones vitrificados.

Nuestra recomendación para el traslado de embriones vitrificados es que éstos se trasladen sumergidos en N<sub>2</sub>L, aunque somos conscientes que ello conlleva restricciones en determinados medios de transporte, como el aéreo.

c) En principio los embriones se trasladan por deseo de la mujer o la pareja y para uso propio, y si más adelante los donan, es responsabilidad del centro receptor disponer de toda la información necesaria para determinar si los embriones son aptos para ser donados a otras personas o sólo pueden donarse para investigación. Por lo tanto, el centro receptor debe asegurarse de que la información recibida junto

con los embriones es suficiente para decidir ante una petición de donación a terceros, si son donables o no.

Y en este contexto surge la duda de la "seroteca" que se exige en el Real Decreto 1301/2006, y que como mínimo debe conservarse durante dos años desde la última transferencia. Si existe suero de la paciente que solicita el traslado y no queda ningún otro material criopreservado en el centro emisor, entendemos que, para cumplir con los requerimientos legales, una muestra del suero debería enviarse también al centro receptor.

d) En el caso de entregar embriones para investigación, el protocolo para el traslado de los embriones debería ser similar al que aquí se ha descrito e igualmente, en estos casos, debería recibirse acuse de recibo del centro receptor para poder mantener la trazabilidad exigida.

## CONCLUSIONES

1. El traslado de embriones criopreservados es una operación de riesgo y así debe informarse a la mujer o la pareja.

2. Hasta la fecha, y por falta de un único protocolo, cada centro de RHA ha establecido sus propios requisitos y el traslado de embriones se realiza frecuentemente de forma improvisada en aras de la "buena fe" de las partes implicadas y atendiendo al bien de los pacientes.

Consideramos que sería enormemente beneficioso aprobar un protocolo estandarizado común que sirva de modelo para todos, que no induzca a dudas y miedos a los pacientes y facilite la labor de los centros. Emplazamos a ASEBIR a abordar el asunto del traslado de embriones criopreservados, tanto para la elaboración de un modelo de protocolo único como para un modelo de Consentimiento Informado ya que éste es uno de los vacíos que actualmente tenemos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASEBIR 2012. Cuadernos ASEBIR de Embriología. Selección de Consultas a la Asesoría Jurídica de ASEBIR (II) p.4-6.

Capalbo A, Rienzi L, Buccheri M, Maggiulli R, Sapienza F, Romano S, et al. The worldwide frozen embryo reservoir: methodologies to achieve optimal results. *Ann NY Acad Sci* 2011; 1221:32-39:9.

Castilla JA, Magán R. Editores en Seguridad biológica en el laboratorio de Reproducción Asistida. Aula de Formación en Embriología Clínica nº 4. Granada 2003 p.86 y ss.

Ley 14/2006 de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. BOE 126, 27/05/2006, p.19947-19956.

Ley 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. BOE 298, 14/12/1999, p.43088-43099.

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE 274, 15/11/2002, p.40126-40132.

Real Decreto 413/1996, de 1 de marzo, que establece los requisitos técnicos y funcionales precisos para la autorización y homologación de los centros y servicios sanitarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida. BOE 72, 23/03/1996, p.11256-11260.

Real Decreto 551/2006, de 5 de mayo, por el que se regulan las operaciones de transporte de mercancías peligrosas por

carretera en territorio español. BOE 113, 12/05/2006, p.18187-18281.

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 270, 11/11/2006, p.39475-39502.

SEF. Informe anual SEF 2009. [www.registrosef.com](http://www.registrosef.com)

Provoost V, Pennings G, De Sutter P, Van de Velde A, Dhont M. Trends in embryo disposition decisions: patients' responses to a 15-year mailing program. *Hum Reprod* 2012; 27:506-514.

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

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



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



**IVIOMICS**   
PIONEROS EN GENÉTICA REPRODUCTIVA

Contacte con nosotros:  
Telf.: 96-3905310 - [info@iviomics.com](mailto:info@iviomics.com)

## DESEQUILIBRIOS CROMOSÓMICOS EN ESPERMATOZOIDES DE INDIVIDUOS PORTADORES DE TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS

### CHROMOSOMAL IMBALANCES IN SPERMATOZOA FROM RECIPROCAL TRANSLOCATION CARRIERS

Anna Godo, Francesca Vidal, Joan Blanco, Ester Anton\*

\*Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).

e-mail: ester.anton@uab.cat

Fecha recepción: 14 Marzo 2012

Fecha aceptación: 4 Abril 2012

#### RESUMEN

Los portadores de translocaciones recíprocas tienen asociado un riesgo genético reproductivo debido a la producción de gametos portadores de alteraciones cromosómicas. Estas alteraciones se pueden cuantificar en espermatozoides mediante estudios de hibridación *in situ* fluorescente. Normalmente se realizan estudios de segregación y de efecto intercromosómico en espermatozoides de un mismo individuo, pero siempre de forma independiente. En consecuencia, las anomalías resultantes de estos dos eventos no pueden relacionarse directamente. El objetivo de este trabajo es hallar la relación entre los modos de segregación del tetravalente y la producción de espermatozoides con anomalías numéricas. Se han estudiado espermatozoides de tres individuos portadores de translocaciones recíprocas, siguiendo un protocolo de análisis secuencial basado en la realización de dos rondas de hibridación consecutivas con un lavado intermedio: la primera para detectar las anomalías numéricas y la segunda para evaluar el resultado de la segregación en los gametos aneuploides/diploides.

Los resultados han demostrado que los espermatozoides portadores de anomalías numéricas presentan una clara desviación del patrón de segregación estándar. En concreto, los espermatozoides aneuploides/diploides presentan un incremento de modos de segregación que implican procesos de no disyunción en el tetravalente; así como una disminución de la segregación equilibrada. Este hecho podría explicarse por la existencia de errores en el punto de control que actúa durante la transición de las fases metafase I y anafase I que permitirían la progresión de espermatozoides con alteraciones cromosómicas. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):12-16.

Palabras clave: FISH, translocación recíproca, ICE, anomalías cromosómicas numéricas, patrón de segregación, espermatozoides.

#### SUMMARY

Carriers of reciprocal translocation entail a particular reproductive risk as a consequence of the production of unbalanced gametes. Sperm fluorescent *in situ* hybridization studies are a useful tool to estimate the frequency of abnormal gametes. Usually, segregation and interchromosomal effect studies are performed in these individuals. Nevertheless, both studies are carried out independently and consequently, anomalies cannot be directly related. The aim of this work was to establish if there is a relationship between the occurrence of specific segregation modes and the production of numerical abnormalities in the same spermatozoa. Semen samples of three reciprocal translocations carriers were analyzed by a sequential fluorescent *in situ* hybridization protocol based on two successive hybridization rounds and probes washing off in-between. Spermatozoa with numerical abnormalities were detected in the first round, and the second round allowed the segregation analysis in the aneuploid/diploid gametes.

Results have shown that spermatozoa with numerical abnormalities show a clear deviation of the standard segregation pattern. In particular, aneuploid/diploid spermatozoa display significant increases of segregation modes that imply quadrivalent non-disjunctions, whereas balanced modes are reduced. A plausible explanation for this deviation might be a failure in the metaphase I-anaphase I checkpoint that would allow the progression of spermatocytes with an abnormal chromosomal content. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):12-16.

Keywords: FISH, reciprocal translocation, ICE, chromosome numerical abnormalities, segregation pattern, spermatozoa.

## INTRODUCCIÓN

La incidencia de portadores de translocaciones recíprocas en la población general es aproximadamente 1/700 (Nielsen and Wohler, 1991), no obstante en la población de individuos infértiles esta cifra puede elevarse hasta seis veces (De Braekeleer and Dao, 1991). La fertilidad de estos individuos está condicionada por la presencia de bloqueos meióticos y/o por la producción de un cierto porcentaje de gametos portadores de anomalías cromosómicas. Estas anomalías se originan mayoritariamente como consecuencia de segregaciones desequilibradas de los cromosomas reorganizados, o bien como resultado de un fenómeno denominado efecto intercromosómico (ICE).

En relación a la segregación de los cromosomas reorganizados, durante la profase I de la meiosis los cuatro cromosomas que comparten segmentos homólogos en un individuo portador de una translocación recíproca adoptan una estructura llamada tetravalente. A lo largo de la anafase I, esta estructura puede resolverse según cinco modos de segregación: Alternante, adyacente I (los centrómeros homólogos migran a polos celulares opuestos), adyacente II, 3:1 y 4:0, (los centrómeros homólogos migran al mismo polo). El modo de segregación alternante es el único que puede dar lugar a gametos normales o equilibrados, mientras que el resto de segregaciones resultará en gametos desequilibrados para los cromosomas reorganizados.

En la literatura existen varios estudios realizados con FISH en espermatozoides sobre la frecuencia de gametos equilibrados y desequilibrados en portadores de translocaciones recíprocas. A pesar de que en algunos casos se describen valores extremos en la frecuencia de segregaciones desequilibradas, con rangos desde 19% hasta el 80% (revisado por Morel et al., 2004), la mayoría de individuos analizados presentan frecuencias que se ajustan al patrón estándar de segregación observado por Anton et al., 2008. Según éste, la segregación preferente es la alternante, con un porcentaje de 46,5%  $\pm$  6.5 (media  $\pm$  DE), mientras

que el resto de modos de segregación se distribuyen de la siguiente forma: Adyacente I (33.6%  $\pm$  4.4); adyacente II (11.7%  $\pm$  6.9); 3:1 (6.8%  $\pm$  3.5) y 4:0 (0.6%  $\pm$  0.6). Las diferencias observadas entre diferentes translocaciones han sido atribuidas clásicamente a las características citogenéticas particulares de los cromosomas reorganizados en cada caso.

El fenómeno de ICE consiste en la producción de gametos con anomalías cromosómicas numéricas no relacionadas con los cromosomas reorganizados. Aunque todavía no hay consenso sobre el origen y relevancia de este fenómeno, se cree que las aneuploidías o diploidías producidas son consecuencia de la existencia de heterosinapsis entre regiones desapareadas del tetravalente con otros bivalentes no implicados en la reorganización (Oliver-Bonet et al., 2005). Estas asociaciones ilegítimas favorecen alteraciones del proceso meiótico, afectando negativamente al apareamiento y disyunción de los cromosomas (Burgoyne et al., 2009). La presencia de gametos con incrementos de al menos un tipo de disomía o diploidía (ICE positivo) es un fenómeno habitual en portadores de translocaciones recíprocas (revisado en Anton et al., 2011).

Los estudios de segregación del tetravalente y de ICE se realizan de forma independiente en distintas fracciones de la muestra, y no es posible establecer relaciones entre los resultados obtenidos. El objetivo de este trabajo es realizar ambos estudios en los mismos espermatozoides mediante una FISH secuencial, y así poder determinar si existe una relación entre la ocurrencia de los diferentes modos de segregación del tetravalente y la producción de anomalías cromosómicas numéricas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de semen procedentes de tres individuos infértiles portadores de translocaciones recíprocas que presentaban los siguientes cariotipos: 46,XY,t(5;8)(q33;q13) (P1); 46,XY,t(8;14)(q22;q32) (P2) y 46,XY,t(9;19)(q10;p10) (P3).

Los tres individuos fueron seleccionados por presentar ICE positivo en estudios previos (Anton et al., 2008). Las muestras se procesaron según el protocolo de FISH en espermatozoides estandarizado en nuestro laboratorio (Sarrate and Anton, 2009), que incluye la fijación, descondensación, desnaturalización y posterior hibridación de las muestras.

Se realizaron dos rondas de hibridación secuencial con un lavado de sondas intermedio:

**1. Primera ronda:** Se realizaron dos estudios paralelos de ICE, analizando las aneuploidías y diploidías de los cromosomas 18, X, Y por un lado y 13, 21 por otro, mediante la utilización del AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). El kit consta de dos combinaciones de sondas para realizar una FISH triple (sondas centroméricas para los cromosomas 18, X e Y) y una FISH dual (sondas locus específicas para los cromosomas 13 y 21).

**2. Lavado de las sondas:** Se eliminaron mediante una solución citrato-sódica salina en condiciones altamente astringentes (0,0625xSSC).

**3. Segunda ronda de hibridación:** Se utilizaron combinaciones específicas de sondas para los cromosomas implicados en cada reorganización, que permitieron identificar los diferentes productos de segregación del tetravalente. Las sondas utilizadas en cada paciente se detallan en la Tabla I.

**Tabla I.** Combinaciones de sondas utilizadas para los estudios de segregación

Paciente	Cariotipo	Sondas
P1	46, XY, t (5;8)(q33; q13)	CEP 8 (SA) LSI 8q24 (SO) LSI 5p15.2 (SG)
P2	46, XY, t (8;14)(q22; q32)	CEP 8 (SA) Tel 14q (SO) Tel 8q (SG)*
P3	46, XY, t (9;19)(q10; p10)	LSI9q34 (SA) Tel 19q (SO) Tel 19p (SG)

SA: Spectrum Aqua, visible con el filtro específico Aqua; SO: Spectrum Orange, visible con el filtro específico Cy3; SG: Spectrum Green, visible con el filtro específico FITC. Todas las sondas son de Vysis, Abbott Molecular Inc., excepto \* (Qbiogene Inc., Irvine, CA, USA)

Referente a los análisis de ICE, las muestras P1 y P3 se valoraron de forma automática con el sistema Spot-Counting (Spot AX software, Applied Imaging, Newcastle, U.K.) (Molina et al., 2009) acoplado al microscopio BX-61 (Olympus, Barcelona, España) equipado con filtros específicos para DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), Aqua, FITC (fluorescein isothiocyanate) y Cy3 (cytochrome 3). Este sistema permite almacenar información relativa a la localización y a los parámetros morfológicos de los núcleos, además del número e intensidad de las señales presentes en cada uno de los espermatozoides analizados. La muestra del individuo P2 se analizó de forma manual con el microscopio BX-60 (Olympus) con un filtro de triple banda y otros específicos para FITC, Cy3, Aqua. En cualquier caso (automático o manual) se capturaron imágenes y se anotó la localización de los espermatozoides aneuploides o diploides valorados en cada panel de cromosomas (Spot AX software; Sensor Control Display,

Marzhauser Wetzlar; Isis Fluorescence Image System, Metasystems, Germany).

El análisis del patrón de segregación se realizó de forma diferencial en dos poblaciones de gametos para cada individuo: (i) fracción aleatoria de espermatozoides (no seleccionados), y (ii) espermatozoides portadores de anomalías numéricas (detectados en los análisis de ICE previos). En este último caso, los espermatozoides aneuploides y diploides se relocalizaron de forma automática o manual, según el método en que se inició el estudio.

Para la valoración de las muestras se siguieron los criterios estrictos de valoración, referentes a la intensidad, el tamaño y la localización de las señales de hibridación descritos en nuestro grupo (Blanco et al., 1996). Para cada individuo, las frecuencias encontradas se analizaron estadísticamente mediante el test  $\chi^2$  (SSP v2.8, Claremont, California), considerando un intervalo de confianza del 95%.

## RESULTADOS

El número de espermatozoides analizados se resume en la Tabla II. En los estudios de ICE, se valoraron un total de 10706 (P1), 5181 (P2) y 12319 (P3) espermatozoides para los cromosomas X, Y, 18; y de 11844 (P1), 4192 (P2) y 10486 (P3) espermatozoides para los cromosomas 13 y 21. En conjunto, se clasificaron como diploides o aneuploides para alguno de los cromosomas analizados un total de 762 (P1), 329 (P2) y 401 (P3) espermatozoides. En la segunda ronda de hibridación (estudio de segregación) se relocalizaron y analizaron los siguientes porcentajes de espermatozoides aneuploides/diploides: 92.4% (704/762) (P1), 83.9% (276/329) (P2) y 94.5% (379/401) (P3). Los productos resultantes de la segregación también se valoraron en una fracción aleatoria de espermatozoides en cada individuo: 396 (P1), 100 (P2) y 100 (P3).

**Tabla II.** Número total de espermatozoides analizados en cada uno de los individuos

Paciente	Análisis ICE <sup>1</sup>	Anomalías numéricas <sup>2</sup>	Análisis segregación muestra seleccionada <sup>3</sup>	Análisis segregación muestra no seleccionada <sup>4</sup>
P1	22550	762	704	396
P2	9373	329	276	100
P3	22805	401	376	100

<sup>1</sup> N° total de espermatozoides valorados en los estudios de ICE para los cromosomas 18/X/Y y 13/21

<sup>2</sup> N° de espermatozoides con anomalías numéricas para alguno de los cromosomas X, Y, 13, 18 o 21 encontrados en los análisis de ICE

<sup>3</sup> N° de espermatozoides con anomalías numéricas relocalizados y valorados en el análisis de segregación

<sup>4</sup> N° de espermatozoides valorados al azar en el análisis de segregación

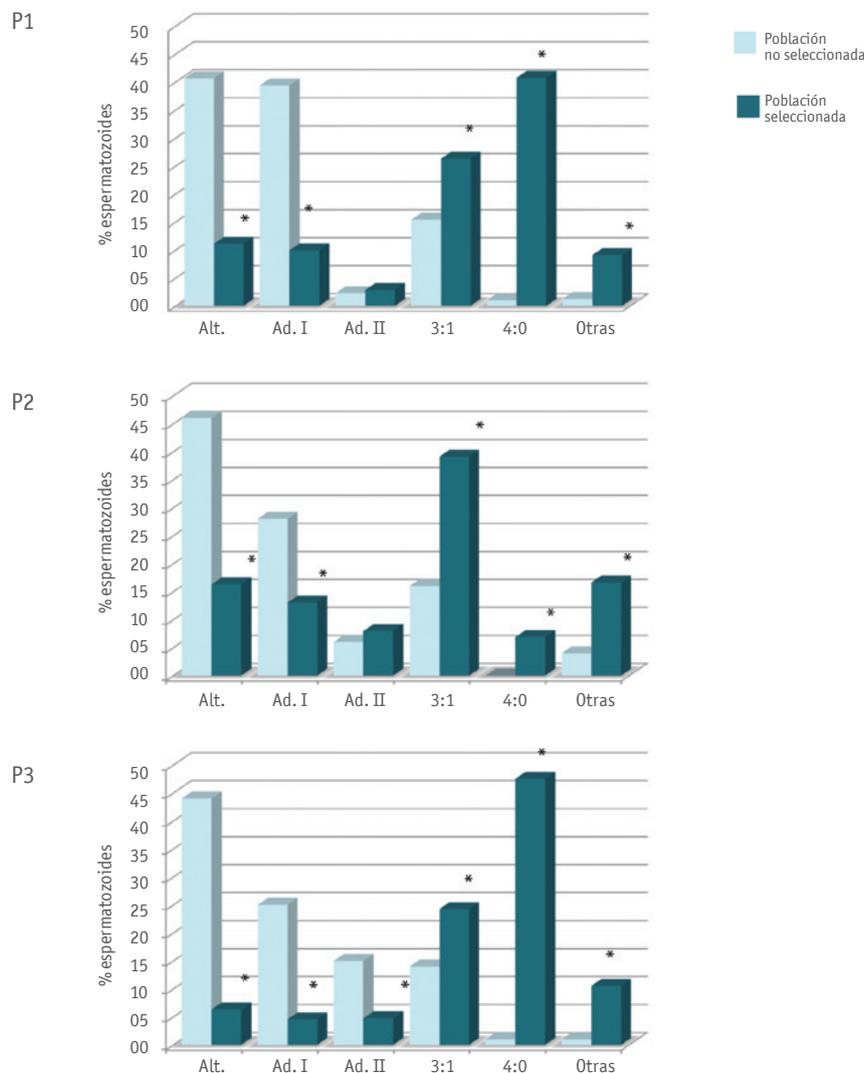
Los resultados referentes a la valoración de los diferentes modos de segregación en las dos poblaciones de espermatozoides analizadas se muestran en la Figura 1.

El análisis en la población no seleccionada muestra un porcentaje de

gametos equilibrados de  $43.5 \pm 2.7\%$  (media  $\pm$  DE), siendo la segregación alternante el modo más representado. Del resto de segregaciones, la que se observó con mayor frecuencia (media  $\pm$  DE) fue la adyacente I ( $30.8 \pm 7.6$ ), seguida de la 3:1 ( $15.1 \pm 1$ ), adyacente II ( $7.8 \pm 6.5$ ) y 4:0 ( $0.7 \pm 0.6$ ).

El análisis de los patrones de segregación en la población de espermatozoides portadores de anomalías numéricas mostró un cambio en los porcentajes de segregación. Los porcentajes de gametos equilibrados fueron tan sólo de 11.1% (P1); 16.3% (P2) y 6.3% (P3). En este caso, los productos de

**Figura 1.** Frecuencias de espermatozoides obtenidas en los análisis de segregación realizados en la muestra seleccionada (portadores de anomalías numéricas) y no seleccionada de P1, P2 y P3



\* indica p-valor <0.05 respecto poblaciones no seleccionadas de espermatozoides

segregación mayoritarios fueron los desequilibrados, con valores medios de (media  $\pm$  DE)  $31.7 \pm 28.1$  (segregación 4:0),  $29.9 \pm 8.1$  (segregación 3:1),  $9.2 \pm 4.3$  (segregación adyacente I) y  $5.2 \pm 2.6$  (segregación adyacente II). La categoría "otras" incluyó combinaciones de sondas no esperadas según los modos teóricos de segregación, y se encontró representada por una media de  $12.1 \pm 4\%$  espermatozoides.

Los resultados de segregación obtenidos en la población de espermatozoides no seleccionados se ajustaron al patrón

estándar observado en portadores de translocaciones recíprocas, en el que predominan los gametos equilibrados productos de la segregación alternante, seguida de la adyacente I (Anton et al., 2008). Por otro lado, los resultados de segregación en la población de gametos portadores de anomalías numéricas mostraron una clara desviación del patrón. Al comparar las frecuencias de cada modo de segregación hallado en las dos poblaciones de espermatozoides estudiadas, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los modos de segregación. En concreto,

en las poblaciones de espermatozoides con anomalías numéricas, se detectó una reducción significativa de las segregaciones alternante y adyacente I. Por otro lado, en esta misma población, se detectaron incrementos significativos de las segregaciones 3:1, 4:0 y de la categoría "otras".

## DISCUSIÓN

La condición aneuploide/diploide se encuentra preferentemente asociada a la presencia de productos de segregación del tetravalente que implican una no

disyunción (centrómeros homólogos en el mismo polo celular), especialmente las segregaciones 3:1 y 4:0. En cambio, las segregaciones alternante y adyacente I (los centrómeros homólogos migran a polos celulares opuestos) se encuentran reducidas significativamente. Estos resultados sugieren que el fenómeno de ICE y las segregaciones desequilibradas 3:1 y 4:0 son sucesos dependientes y que están condicionados por las interacciones cromosómicas que se establecen durante el proceso meiótico (heterosinapsis), y por el nivel de eficiencia de los puntos de control. En consecuencia, los portadores de translocaciones recíprocas producen espermatozoides que acumulan anomalías cromosómicas procedentes de dos orígenes distintos.

La heterosinapsis se produce en portadores de translocaciones recíprocas entre el tetravalente y regiones asinápticas de otros bivalentes (Oliver-Bonet et al., 2005). Este mecanismo se ha descrito como una estrategia que adopta el espermatocito para evitar la activación del punto de control de sinapsis y recombinación en la etapa de paquiteno (profase I) que conllevaría apoptosis (Sciurano et al., 2007). Los resultados obtenidos indican que la heterosinapsis podría tener un efecto recíproco, que condicionaría tanto la segregación del tetravalente como la de otros bivalentes implicados.

Por otro lado, durante la transición metafase I-anafase I, la presencia del tetravalente en la placa metafásica podría implicar una activación prolongada del punto de control de formación del huso meiótico (SAC) (Vogt et al., 2008). En esta situación, la formación de gametos desequilibrados y con anomalías numéricas se podría originar por dos vías. En primer lugar, la no reparación de las anomalías detectadas podría derivar en la ausencia de citocinesis y la consecuente producción de espermatozoides diploides (Egozcue et al., 2000). En segundo lugar, existen indicios de que el punto de control del SAC no es del todo eficiente en la detección y eliminación de espermatoцитos con alteraciones en la disposición de los bivalentes en el huso meiótico (Eaker

et al., 2001). En células portadoras de translocaciones recíprocas, el número de espermatoцитos con este tipo de alteraciones es muy elevado. En esta situación, es plausible esperar una frecuencia de gametos con alteraciones cromosómicas que escapen al SAC proporcionalmente incrementada. Estos eventos explicarían por qué la célula presentaría errores derivados de una segregación anómala de los cromosomas reorganizados, además de errores en la disyunción de otros cromosomas.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con la financiación de los proyectos SAF2010-22241, SGR2009-282 y UAB CF-180034. AG es beneficiaria de una beca predoctoral PIF 456-01-4/2011. Queremos agradecer el suministro de las muestras a los centros I.B.Q. Flor de Maig y CPC (Barcelona).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anton E, Vidal F, Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behaviour. *Genet Med*. 2008;10:730-8.

Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod*. 1996;11:722-6.

Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JMA. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genetics*. 2009;10:207-16.

De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*. 1991;6:245-250.

Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci*. 2001;114:2953-2965.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000;6:93-105.

Molina O, Sarrate Z, Vidal F, Blanco J. Fish on sperm: spot-counting to stop counting? Not yet. *Fertil Steril*. 2009;92:1474-1480.

Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Amice V, Amice J, et al. Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int Journal of Andrology*. 2004;27:200-212.

Nielsen J, Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet*. 1991;87:81-83.

Oliver-Bonet M, Benet J, Sun F, Navarro J, Abad C, Liehr T, et al. Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Hum Reprod*. 2005; 20:683-688.

Sarrate Z, Anton E. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) Protocol in Human Sperm. *J Vis Exp*. 2009;31. pii:1405. doi: 10.3791/1405.

Sciurano R, Rahn M, Rey-Valzacchi G, Solari AJ. The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant gamma-H2AX and associates with the XY body. *Hum Reprod*. 2007;22:142-50.

Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res*. 2008;651:14-29.

# PATRÓN DE MOVILIZACIÓN DEL $[Ca^{2+}]_i$ , APOPTOSIS Y PAPEL DE LA ACTINA EN PACIENTES ASTENOZOOSPÉRMICOS

## **$[Ca^{2+}]_i$ MOBILIZATION, APOPTOSIS AND ROLE OF ACTIN IN ASTHENOZOOSPERMIC PATIENTS**

\*Graciela M. Lozano, Águeda Ortiz, Fabián Monllor, M<sup>a</sup> Isabel Jiménez, Juan Francisco García.

Hospital Materno Infantil. Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida (C.E.R.H.A). C/ Violeta SN. 06010. Badajoz

e-mail: laoliventina@hotmail.com

Fecha recepción: 30 Marzo 2012

Fecha aceptación: 12 Abril 2012

### RESUMEN

La astenozoospermia se caracteriza por la disminución o ausencia total de movilidad espermática y es una de las alteraciones más comunes en los pacientes estériles. La señalización de calcio intracelular es una importante llave reguladora de muchos procesos celulares, entre ellos el movimiento espermático.

El objetivo de este trabajo es analizar el papel del calcio en las muestras de pacientes astenozoospermicos estimulando la señal de calcio intracelular con progesterona. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):17-25

Palabras clave: Astenozoospermia, Calcio, Progesterona, Citoesqueleto, Apoptosis.

### SUMMARY

Asthenozoospermia is characterized by reduced forward motility or absent sperm motility and is a common cause in male infertility. The Calcium signalling is a pivotal key in sperm physiology involved in the motility of the sperm.

We investigated the role of calcium signalling evoked by progesterone. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):17-25

Key words: Asthenozoospermia, Calcium, Progesterone, Cytoskeleton, Apoptosis.

### INTRODUCCIÓN

Está bien establecido que la señalización del  $[Ca^{2+}]_i$  juega un papel importante en la fisiología del espermatozoide humano, estando íntimamente relacionado con muchos aspectos funcionales de los mismos (Félix, 2005; Jiménez-González et al., 2006), tales como el control de la movilidad, incluyendo hiperactivación y quimiotaxis, donde la señalización del  $[Ca^{2+}]_i$  es imprescindible para producir el movimiento del flagelo.

De hecho, una movilidad anormal podría estar relacionada con niveles bajos en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  (Luconi, 2003), debido a alteraciones en la entrada capacitativa de calcio (ECC) a través de canales específicos pudiendo influir también en la reacción acrosómica (RA) de los espermatozoides (Rossato, 2001).

El aumento citosólico de calcio se puede favorecer con dosis micromolares de

progesterona (Kirkman-Brown et al., 2002; Bedu-Addo et al., 2007) probablemente provocadas por la interacción de la progesterona con receptores de superficie presentes en los espermatozoides (Blackmore et al., 1994).

Esta habilidad de la progesterona para producir un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$  en espermatozoides humanos ha sido directamente correlacionada con éxitos de fecundación *in vitro* (Krausz et al., 1996; Publicover et al., 2008).

La progesterona está presente en altas concentraciones en el líquido folicular y es sintetizada antes y después de la ovulación por células del cúmulo oóforo del ovocito. Aunque la capacidad de la progesterona para inducir la RA está bien establecida, parece ser que el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  que produce está relacionado con la regulación de la actividad flagelar y de la quimiotaxis (Ulher et al., 1992), resultando ser un potente quimioatrayente para el espermatozoide humano, pudiendo actuar sus receptores

como receptores quimiotácticos (Eisenbach et al., 2006). Al mismo tiempo, aumentos en la señalización y concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  pueden revelarse como señales apoptóticas que induzcan a la célula a una muerte programada. El equilibrio entre el aumento de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  y la capacidad de la célula para responder a estos estímulos es crucial para la supervivencia celular.

La astenozoospermia es una causa común de esterilidad masculina caracterizada por una reducción o ausencia total de movilidad espermática. Alteraciones de los factores que regulan la movilidad espermática y su estructura celular y metabólica son los responsables de este defecto, de hecho, en los últimos años, se ha comprobado que en pacientes con astenozoospermia, hay una reducción de los receptores de progesterona (Gadkar et al., 2002), así como una relación entre la infertilidad masculina y la incapacidad de esos espermatozoides para responder a progesterona *in vitro* (Krausz et al., 1995).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Progesterona, albúmina bovina (BSA), medio de lavado RPMI-1640, dimetil BAPTA, RU-38486, etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA) (Sigma, Madrid, España).

Fura-2 acetoximetil ester (fura-2/AM) y thapsigargina (Invitrogen, Barcelona, España).

citocalasina D y jasplakinolide (Calbiochem, Darmstadt, Alemania).

Receptor Anti-progesterona (PRc262) y anticuerpo monoclonal de ratón (RU-38486) (Santa Cruz Biotechnology, Alemania).

Sustrato de caspasa-3 (AC-DEVD-AMC) (Sigma, Madrid, España).

Las determinaciones de apoptosis se realizaron mediante el ensayo TUNEL (Terminal dUTP Nick-End Labeling) (Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, USA).

## PREPARACIÓN DEL SEMEN

Las muestras de semen se obtuvieron de 37 varones normozoospermicos y 33 astenozoospermicos que acudieron al Centro Extremeño de Reproducción Humana Asistida (C.E.R.H.A) en Badajoz, para estudio de esterilidad. Este trabajo fue aprobado por el comité ético del Hospital Infanta Cristina de Badajoz y por la Universidad de Extremadura de acuerdo con la declaración de Helsinki.

A cada paciente se le sometió a una completa anamnesis confirmando su buen estado de salud, no eran fumadores, ni bebían alcohol, ni estaban siguiendo ningún tratamiento médico.

Las muestras se obtuvieron por masturbación tras un periodo de abstinencia de entre 4 y 5 días y se dejaron licuar a 37°C durante 30 minutos.

Los parámetros básicos seminales que se analizaron, se realizaron de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS (OMS,

1999). La concentración espermática y la movilidad se midieron mediante el sistema de imagen digitalizado CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) que analiza 25 fotogramas en un campo magnificado de 100x en campo oscuro.

La normozoospermia se clasificó por una concentración espermática de  $\geq 20 \times 10^6$  cels/ml ( $x \pm SD = 62 \pm 30 \times 10^6$  cels/ml), una movilidad progresiva (grado a + b)  $\geq 50\%$  ( $x \pm SD = 54.2 \pm 4.1\%$ ) y una morfología normal  $\geq 14\%$  ( $x \pm SD = 17 \pm 3.6\%$ ).

El principal criterio de clasificación de muestras astenozoospermicas fue una baja movilidad (Curi et al., 2002). La astenozoospermia se caracterizó por una concentración espermática de  $> 20 \times 10^6$  cels/ml ( $x \pm SD = 42 \pm 16 \times 10^6$  cels/ml) y una movilidad reducida (grado a+b)  $< 50\%$  ( $x \pm SD = 23.3 \pm 12.2\%$ ) o ausencia de movilidad, independientemente de los resultados morfológicos.

A continuación las muestras se lavaron en medio RPMI-1640 (250 g, 10 min), se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron en una solución de Na-HEPES que contiene (en mM): NaCl, 140; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 1.2; MgCl<sub>2</sub>, 1.1; glucosa, 10; y HEPES, 10 (pH 7.4).

MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR  $[Ca^{2+}]_i$ 

Las células se incubaron con 4  $\mu$ M fura-2 acetoximetil ester (Fura-2 AM) durante 30 minutos a temperatura ambiente, siguiendo protocolos publicados (Bejarano et al., 2008). Después se lavaron y se utilizaron en las siguientes 2-4 horas.

La fluorescencia se midió en suspensiones celulares ( $2 \times 10^8$  cels/ml) a 37°C usando un espectrofluorofotómetro Shimadzu con longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm y de emisión de 505 nm.

Los cambios en las concentraciones de  $[Ca^{2+}]_i$  se monitorizaron usando el ratio de fluorescencia fura-2 340/380 nm y se calibraron de acuerdo al método de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985).

En los experimentos libres de calcio, se añadió etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA) al medio.

La entrada capacitativa de calcio (ECC) así como su aumento y mantenimiento se midieron a los 2.5 minutos tras la adición de CaCl<sub>2</sub> o progesterona + thapsigargina, respectivamente.

## DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CASPASA-3

Las células se incubaron con solución sustrato de caspasa-3 (AC-DEVD-AMC) unido a una sonda fluorescente durante 1 hora a 37°C. La actividad de la caspasa-3 se determinó por la fluorescencia producida al fragmentarse el sustrato con la ayuda de un espectrofluorímetro con una onda de excitación de 360 nm y emisión de 460 nm.

## DETERMINACIÓN DE LA EXTERNALIZACIÓN DE FOSFATIDIL SERINA (PS)

Las células se fijaron en glutaraldehído e incubaron con Anexina-V unida a una sonda fluorescente de isotiocianato (Anexin-V-FITC). La fluorescencia se midió con ayuda de un espectrofluorímetro con una onda de excitación de 488 nm y emisión de 516 nm.

## DETERMINACIÓN DE TUNEL

Las muestras sometidas a técnicas de TUNEL tras su incubación con progesterona se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4%. El ADN dañado se detectó por la TdT (deoxinucleotidil Transferasa Terminal) medida por dUDP aplicándose la técnica según protocolo de la casa comercial. Se revelaron con fluorescencia y los espermatozoides que presentaban su citoplasma con fluorescencia verde se contabilizaron como espermatozoides apoptóticos (TUNEL positivo).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba T de Student ( $p < 0.05$  se considera estadísticamente significativo).

## RESULTADOS

En ausencia de calcio extracelular, los espermatozoides se incubaron con la sonda fluorescente fura-2 y con 20  $\mu\text{M}$  de progesterona.

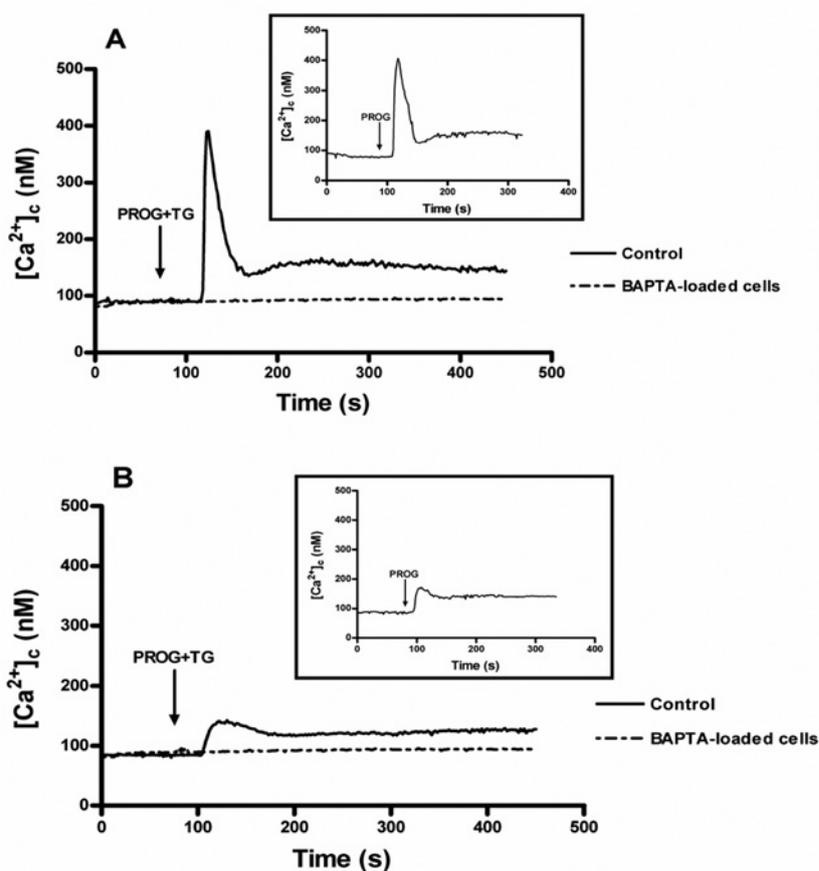
Aunque la presencia de la ATPasa en el retículo endoplasmático (RE) del espermatozoide está sometida a debate, añadimos al cultivo 1  $\mu\text{M}$  de thapsigargina, un inhibidor de

la recaptación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por el RE, asegurándonos de que los depósitos celulares no se recargaban.

En la Figura 1 podemos ver cómo al incubarse con progesterona y thapsigargina, se inducía un aumento en la concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que provenía de los depósitos intracelulares tanto en pacientes normozoospermicos (Figura 1.A) como en astenozoospermicos (Figura 1.B) aunque en esta segunda

gráfica, este aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  era menor siendo muy similar tanto si se añadía progesterona como si se añadía progesterona + thapsigargina.

Cuando se añadía Dimetil-Bapta (BAPTA), un quelante del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , 10 minutos a 37° C, no se producía ningún aumento del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tras incubarse con progesterona o con progesterona + thapsigargina.



**Figura 1.** Elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tras incubarse con progesterona en un medio libre de calcio. En ambos casos, el aumento de calcio es independiente de thapsigargina y en presencia de un quelante del calcio (BAPTA), este aumento no se produce.

**Figura 1.A.** Aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en pacientes normozoospermicos.

**Figura 1.B.** Aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en pacientes astenozoospermicos, claramente inferior.

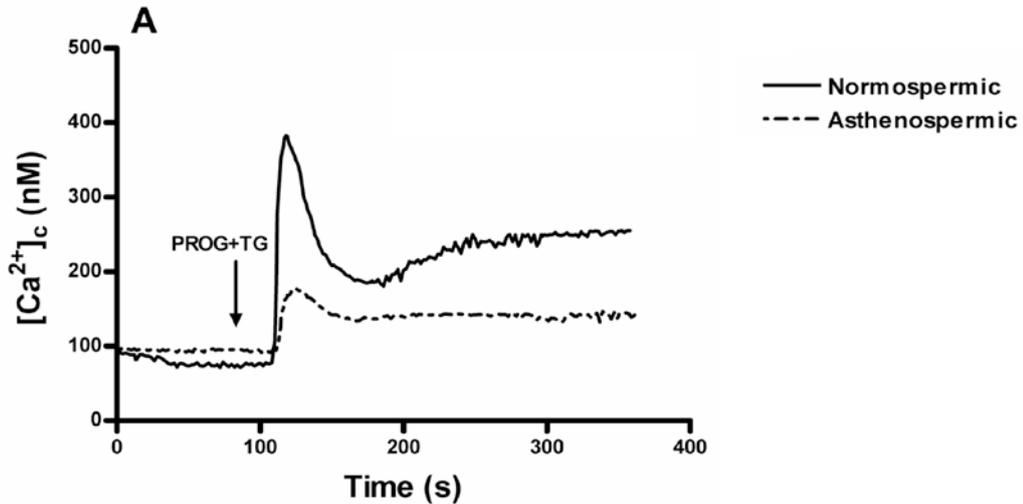
En ambos casos, los espermatozoides cargados con fura-2 eran estimulados con 20  $\mu\text{M}$  de progesterona y con progesterona + 1  $\mu\text{M}$  de thapsigargina en un medio libre de calcio (+ 1mM EGTA), en ausencia (control) o en presencia de BAPTA (10  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos).

Las trazas son representativas de 5 experimentos diferentes.

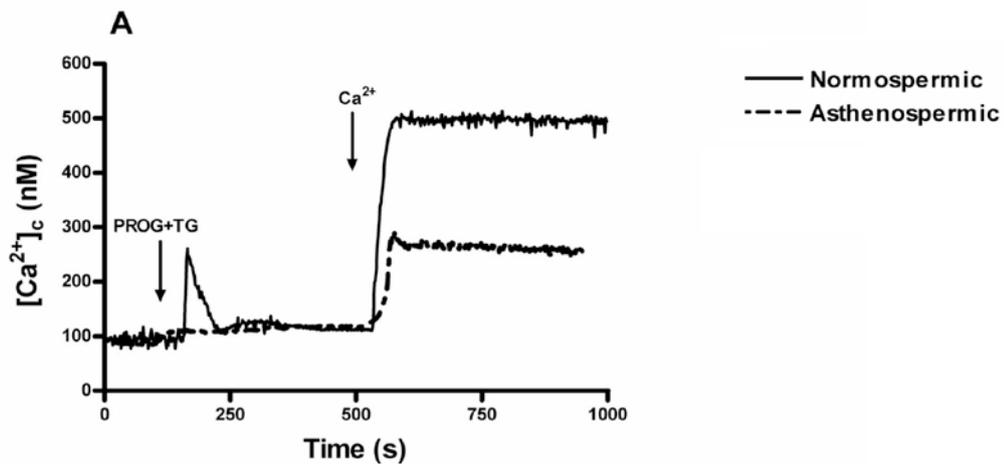
En presencia de calcio extracelular, tras incubar las células con progesterona y con progesterona + thapsigargina, también aumentaba la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 2.A), siendo similar en presencia o ausencia de thapsigargina.

Tras añadir progesterona + thapsigargina, para inducir aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  sin recaptación de los depósitos intracelulares, durante 6 minutos, en un medio libre de calcio, añadimos calcio al medio (300  $\mu$ M de

$CaCl_2$ ) y se pudo comprobar como se producía una ECC en ambos grupos de pacientes, normozoospermicos y astenozoospermicos siendo claramente menor en este último (Figura 3.A).



**Figura 2.A.** Al añadir calcio al medio extracelular, también se produce un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  que continúa siendo menor en pacientes astenozoospermicos y que también sigue siendo independiente de la thapsigargina. En ambos casos, los espermatozoides cargados con fura-2 eran estimulados con 20  $\mu$ M de progesterona + 1  $\mu$ M de thapsigargina en un medio con calcio (1.2 mM  $[Ca^{2+}]_0$ ). Las trazas son representativas de 4 experimentos.



**Figura 3.A.** ECC tras añadir calcio al medio extracelular era menor en pacientes astenozoospermicos. En ambos casos, los espermatozoides cargados con fura-2 eran estimulados con 20  $\mu$ M de progesterona + 1  $\mu$ M de thapsigargina durante 6 minutos en un medio libre de calcio (+ 100  $\mu$ M EGTA) seguido de la adición de calcio al medio con 300  $\mu$ M de  $CaCl_2$  para iniciar la entrada de calcio. Las trazas son representativas de siete experimentos distintos

Analizamos el efecto de 20  $\mu\text{M}$  de progesterona en la incubación de espermatozoides sobre su movilidad progresiva midiéndola con CASA tras 30 minutos de incubación. (Tabla I)

También se analizó si los receptores para la progesterona presentes en

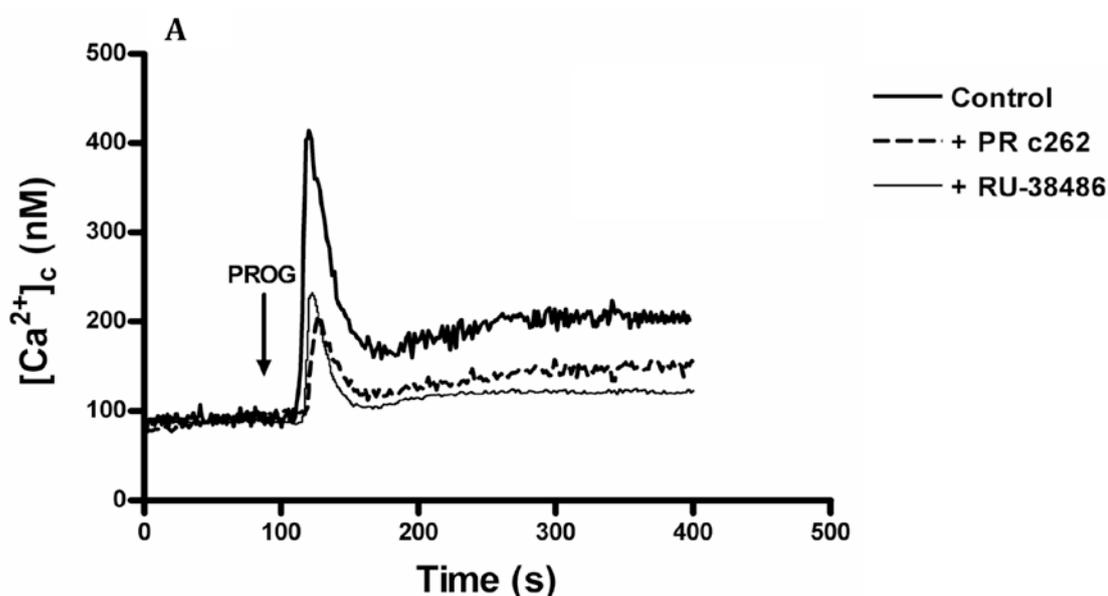
los espermatozoides de pacientes normozoospermicos estaban implicados en la estimulación que la progesterona realiza para aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Para ello, se incubaron las muestras con receptores agonistas de la progesterona (PRc262) (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  30min) y antagonistas de estos

mismos receptores (RU-38486) (50  $\mu\text{M}$  30 min) y se comprobó cómo el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se reducía en ambos casos, resultando un comportamiento similar al observado en pacientes astenozoospermicos incubados con progesterona sin bloqueo de receptores (Figura 4.A).

**Tabla I.** La incubación con progesterona de muestras de pacientes normozoospermicos parece mejorar su movilidad de manera significativa, mientras que las muestras correspondientes a pacientes astenozoospermicos no ven modificado su patrón de movilidad.

	Espermatozoides sin tratar (%) Tipo A	Espermatozoides tratados con PROG (%) Tipo A
Normozoospermicos	54.2 $\pm$ 4.1*	70.5 $\pm$ 2.3*
Astenozoospermicos	23.3 $\pm$ 12.2	23.3 $\pm$ 12.2

\* $p < 0.05$  para la movilidad de espermatozoides de pacientes normozoospermicos tratados con 20  $\mu\text{M}$  progesterona durante 30 minutos.



**Figura 4.A.** Al bloquear en muestras de pacientes normozoospermicos los receptores de progesterona, el aumento de calcio es menor y muy similar al producido en pacientes astenozoospermicos a los que no se les ha realizado bloqueo de receptores de progesterona (ver Fig.1B).

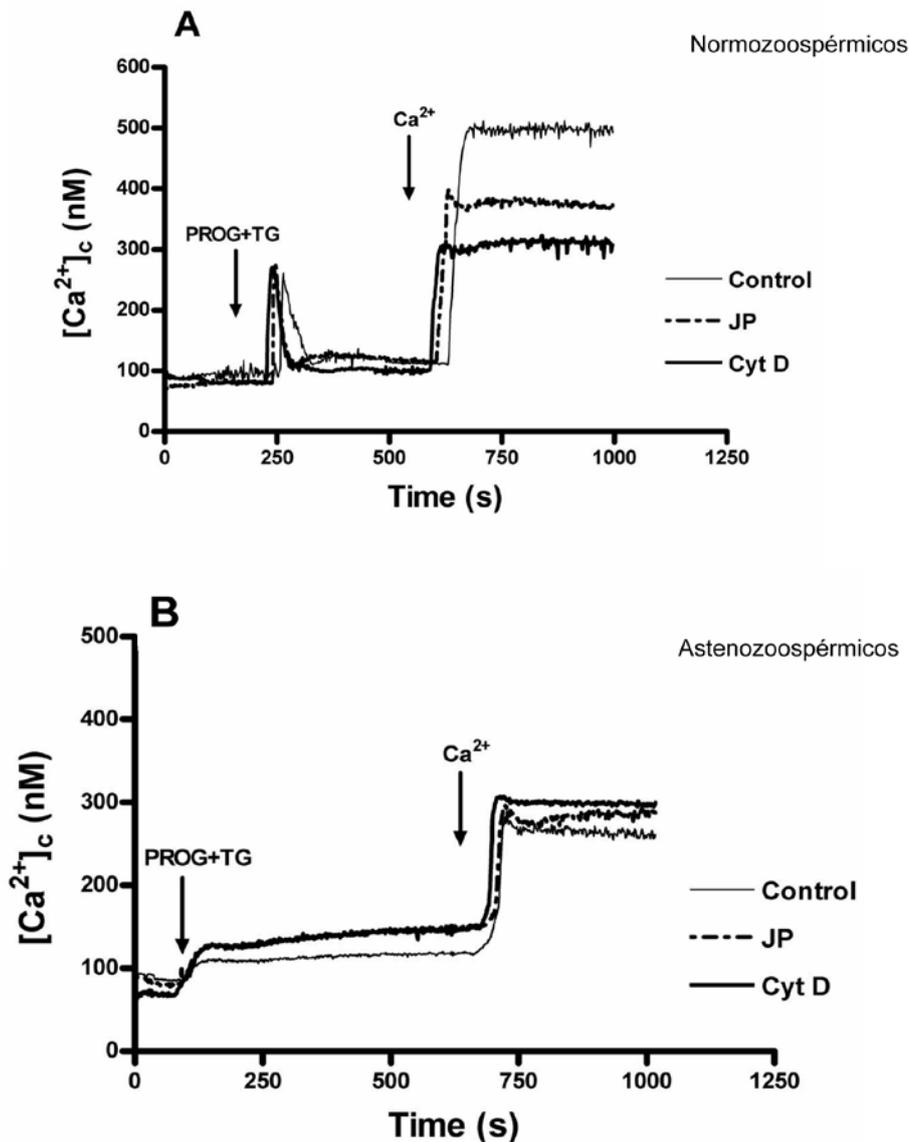
Los espermatozoides cargados con fura-2 de pacientes normozoospermicos fueron tratados previamente con PRc262 (1:10 de concentración final 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 30 minutos) o con RU-384886 (50  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos) eran estimulados con 20  $\mu\text{M}$  de progesterona en un medio con calcio (1.2 mM progesterona  $[\text{Ca}^{2+}]_0$ ).

Las trazas son representativas de 4 experimentos.

La citocalasina D es un potente inhibidor de la polimerización de la actina y el jasplakinolide estabiliza los filamentos de actina *in vitro*, pero *in vivo*, produce la organización de actina en masas amorfas.

En pacientes normozoospermicos, cuando se incubaron los espermatozoides en un medio libre de calcio con progesterona + thapsigargina, citocalasina D y jasplakinolide y tras 6 minutos de incubación se añadía calcio al medio, la ECC tuvo lugar por

vaciamiento de los depósitos celulares en menor medida que sin la incubación de citocalasina D y jasplakinolide, vaciamiento que no ocurrió en pacientes astenozoospermicos y por lo tanto no se produjo la ECC. (Figura 5.A y Figura 5.B).



**Figura 5.** En ambos casos, los espermatozoides cargados con fura-2 fueron tratados previamente a temperatura ambiente con  $10 \mu\text{M}$  de citocalasina D durante 40 minutos o con  $10 \mu\text{M}$  de Jasplakinolide durante 30 minutos. Después, eran estimuladas con  $20 \mu\text{M}$  de progesterona +  $1 \mu\text{M}$  de thapsigargina en un medio libre de calcio (+  $100 \mu\text{M}$  EGTA) durante 6 minutos seguido de la adición de calcio al medio con  $300 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  para iniciar la entrada de calcio.

Las trazas son representativas de siete experimentos.

**Figura 5.A.** Los espermatozoides de pacientes normozoospermicos tratados con citocalasina D y jasplakinolide, presentan una disminución en su ECC provocada por el vaciamiento de los depósitos celulares evocados por la incubación previa con progesterona.

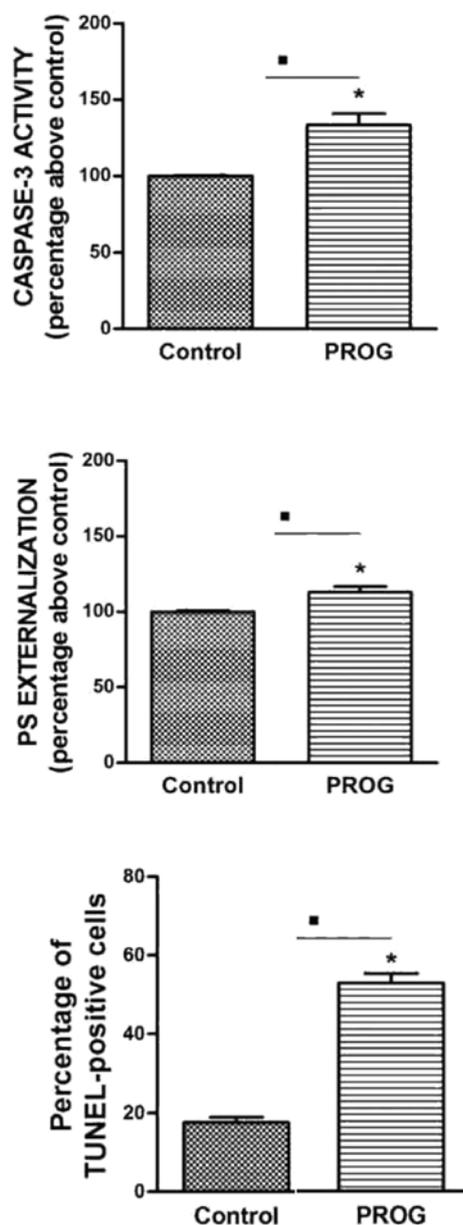
**Figura 5.B.** El mismo experimento en pacientes astenozoospermicos parece ser totalmente inefectivo deduciéndose que la incubación con citocalasina D y jasplakinolide no parece afectar a la ECC tras la estimulación con progesterona en espermatozoides de pacientes astenozoospermicos

Se comprobó el efecto de la progesterona en pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos y su efecto en la aparición de apoptosis.

Para ello, quisimos comprobar en pacientes normozoospermicos si la incubación de las muestras con progesterona durante 1 hora a 20  $\mu\text{M}$ ,

en las que habíamos comprobado un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con menor tiempo de incubación previamente, también se podría ver modificado su patrón de muerte celular programada determinado por la inducción de actividad caspasa-3, externalización de PS y aparición de espermatozoides TUNEL positivos. (Figuras 6.A.B.C).

Tras ratificar que estas condiciones no fisiológicas de incubación con progesterona inducían apoptosis, analizamos mediante la técnica de TUNEL muestras de pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos tras una hora de incubación con progesterona.



**Figura 6.** Patrón de apoptosis en muestras normozoospermicas incubadas con progesterona.

En todos los casos, los espermatozoides eran incubados con 20  $\mu\text{M}$  de progesterona durante 1 hora. El control corresponde a la medición de actividad caspasa-3, externalización de PS y figuras TUNEL positivas en espermatozoides sin incubar previamente con progesterona.

**Figura 6.A.** Determinación de actividad caspasa-3 positiva. (33.5  $\pm$  7.2% con progesterona sobre las células control). (\* $P$ <0.05).

**Figura 6.B.** Determinación de externalización de PS. Medida por el porcentaje de células anexina-V positivas (12.9  $\pm$  3.7% con progesterona sobre las células control). (\* $P$ <0.05).

**Figura 6.C.** Determinación de apoptosis (TUNEL positivas). (52.9  $\pm$  2.4% con progesterona sobre las células control). (\* $P$ <0.05).

Pudimos comprobar que la proporción de espermatozoides apoptóticos medidos por la técnica de TUNEL era significativamente mayor en muestras de pacientes astenozoospermicos. (Tabla II).

## DISCUSIÓN

La progesterona es el agonista movilizador de  $[Ca^{2+}]_i$  más estudiado en los espermatozoides humanos, provocando aumentos sostenidos en el tiempo de  $[Ca^{2+}]_i$ .

Los experimentos en los que se incubaron con progesterona + thapsigargina, parecían ser idénticos a los experimentos en los que se incubaron sólo con progesterona. Al no mostrar sensibilidad a la thapsigargina, ésta parece no contribuir al relleno de calcio

**TABLA II.** El mayor porcentaje de apoptosis se encuentra en muestras con peor concentración y movilidad

	TUNEL < 15%	TUNEL 15-30%	TUNEL > 30%
Concentration x(10 <sup>6</sup> /ml)	36.25±8.56*†	19.44±8.45†	12.5±2.88†
Motility A+B (%)	52.26±5.87*†	41.31±9.39†	30.33±7.57

\* p<0.05 regarding TUNEL 15-30% values

† p<0.05 regarding TUNEL > 30% values

de los depósitos celulares al incubarse con progesterona (Espino et al., 2009).

Por otro lado, la ECC parece estar relacionada en varios trabajos recientes con la regulación del movimiento espermático. Esta ECC se ve favorecida al añadir calcio al medio extracelular en pacientes normozoospermicos, jugando un papel muy importante las concentraciones de calcio extracelulares en la movilidad espermática (Bedu-Addo et al., 2008).

Sin embargo, en pacientes astenozoospermicos, la ECC es casi indetectable con o sin calcio en el medio extracelular. La incubación con progesterona no induce aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  ni por ECC ni por vaciamiento de los depósitos celulares, comportamiento similar observado en los pacientes normozoospermicos a los que se les había bloqueado los receptores de progesterona.

Cuando se añadía en el cultivo citocalasina D (inhibidor de la polimerización de actina) y jasplakinolide (reorganizador de los filamentos de actina en masa amorfa) (Bubb et al., 1994; Bubb et al., 2000), comprobamos que la ECC se veía afectada de forma significativa en

pacientes normozoospermicos, ECC que sin la incubación previa de citocalasina D y jasplakinolide sí se producía. Esto nos hace pensar que los movimientos y estados de los depósitos celulares son fundamentales en la homeostasis del calcio, dando importancia al citoesqueleto celular para una correcta ECC.

Del mismo modo, cuando se incubaron con progesterona en condiciones no fisiológicas, se desencadenó apoptosis en los espermatozoides cursando también aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ . En este caso, la apoptosis intrínseca (Bejarano et al., 2009) inducida en los espermatozoides producía la externalización de PS, actividad caspasa-3 y se podía detectar mediante técnica de TUNEL (Lozano et al., 2009; Lozano et al., 2009).

A pesar de que la dosis y el tiempo de incubación eran no fisiológicos y los mismos en espermatozoides de pacientes normozoospermicos y astenozoospermicos, la apoptosis medida por TUNEL producida en estos últimos era significativamente mayor, no disponiendo de mecanismos para responder a la progesterona *in vitro* para estimular el movimiento, como observamos en la primera parte de los experimentos, ni tampoco de

mecanismos de protección frente a la actividad caspasa y desencadenamiento de la apoptosis.

## CONCLUSIÓN

Los espermatozoides provenientes de pacientes astenozoospermicos disponen de una maquinaria dañada incapaz de responder a los estímulos positivos de la progesterona para movilizar sus reservas de calcio y generar movimiento, y también incapaz de protegerse en la misma medida de los daños celulares inducidos, como lo hacen las muestras normozoospermicas

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por Merck Farma y Química, S.L (Merck Serono), apoyados por Salud 2000 y la Junta de Extremadura.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bedu-Addo K, Barrat CL, Kirkman-Brown JC, Publicover SJ. Patterns of  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol* 2007; 302: 324- 332.

Bedu-Addo K, Costello S, Harper C, Machado-

Oliveira G, Lefievre L, Ford C, Barrat C, Publicover S. Mobilisation of the stored calcium in the neck region of the human sperm—a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int Dev Biol* 2008; 52: 615-626.

Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, García JF, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA. Caspase 3 activation in human spermatozoa response to Hydrogen Peroxide and Progesterone. *Fertil Steril* 2008; 90: 1340-1347.

Blackmore PF, Im WB, Bleasdale JE. The cell surface progesterone receptor which simulates influx in human sperm is unlike the A ring reduced steroid site on the GABA<sub>A</sub> receptor/chloride channel. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 104: 237-243.

Bubb MR, Senderowicz AM, Sausville EA, Dunacan KL, Korn ED. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem* 1994; 269:14869-14871.

Bubb MR, Spector I, Beyer BB, Fosen KM. Effects of Jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain *in vivo* observations. *J Biol Chem* 2000; 275: 5163-5170.

Curi S, Ariagno J, Repetto H, Chenlo P, Mendeluk G, Pugliese N, Sardi M, Blanco A. Laboratory methods for the diagnosis of Asthenozoospermia. *Arch Androl* 2002; 48: 177-180.

Eisenbach M, Giojalas LC. Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 276-285.

Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz A, García JF, Pariente JA, Rodríguez AB. Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from

Asthenozoospermic patients. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7: 11.

Felix R. Molecular physiology and pathology of  $[Ca^{2+}]_i$ -conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reproduction* 2005; 129: 251-262.

Gadkar S, Shah CA, Sachdeva G, Samant U, Puri PC. Progesterone receptor as an indicator of sperm function. *Biol Reprod* 2002; 67: 1327-1336.

Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $[Ca^{2+}]_i$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.

Jimenez-González C, Michelangeli F, Harper CV, Barrat CL, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: A specialized “toolkit” of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 253-267.

Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barrat CL, Publicover SJ. Zona pellucida and progesterone-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signalling and acrosome reaction in human spermatozoa. *L Androl* 2002; 23: 306-315.

Krausz C, Bonaccorsi L, Luconi M, Fuzzi B, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G, Baldi E. Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to Progesterone in human spermatozoa are correlated with *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 122-124.

Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B, Pellegrini S, Forti G, Baldi E. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in *in-vitro* fertilisation. *Human Reprod* 1996; 11: 661-667.

Lozano GM, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Relationship between Caspase activity and Apoptotic Markers in human sperm in response to Hydrogen Peroxide and Progesterone. *J Reprod Dev* 2009; 55:1-7.

Lozano GM, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Density gradient capacitation is the most suitable method to improve fertilization and to reduce DNA fragmentation positive spermatozoa of infertile men. *Anatol J Obstet Gynecol* 2009; 3: 1.

Luconi M, Baldi E. How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. *Cell Mol Biol* 2003; 49: 357-369.

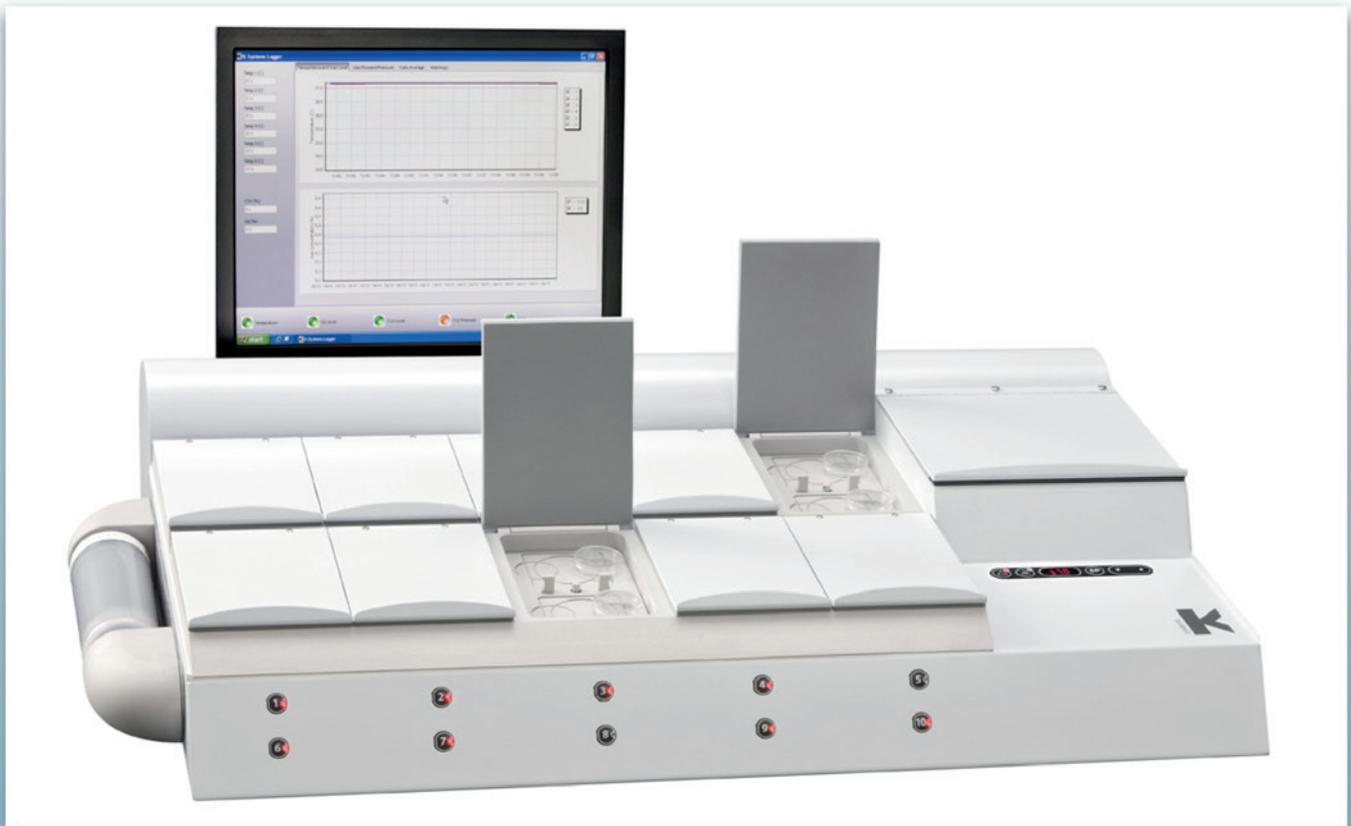
Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, de Oliveira GS, García AA, Barrat CL, Harper CV.  $Ca^{2+}$  signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci* 2008; 13: 5623-5637.

Rossato M, Di Virgilio F, Rizzuto R, Galeazzi C, Foresta C. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: Role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 119-128.

Uhler ML, Leung A, Chan SY, Wang C. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1992; 58: 1191-1198.

World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction 4<sup>ed</sup>. New York: Cambridge University Press; 1999.

# IVF Incubator G-185



## Sistema de almacenamiento G-185



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

## Cámaras independientes de cultivo



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



# RI Witness™



## Pantalla táctil de captura de datos



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

## Lector por radiofrecuencia



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

## LAVADO SEMINAL EN VARONES SEROPOSITIVOS PARA EL VIH. ¿ESTÁ TODO RESUELTO?

### SPERM WASH IN HIV SEROPOSITIVE MEN. IS EVERYTHING SOLVED?

M<sup>a</sup> Carmen Galbis<sup>1</sup>, José Remohí<sup>1</sup>, Antonio Pellicer<sup>1,2</sup>, Nicolás Garrido<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Universitario IVI, Valencia; <sup>2</sup> Hospital Universitario y Politécnico La Fé

e-mail: nicolas.garrido@ivi.es

Fecha recepción: 10 Octubre 2011

Fecha aceptación: 16 Diciembre 2011

#### RESUMEN

La prevalencia del VIH en pacientes en edad fértil junto con el aumento de la expectativa y calidad de vida derivadas de la introducción de los tratamientos antirretrovirales de gran actividad ha hecho que cada vez más parejas en las que sólo uno de sus miembros es seropositivo (parejas serodiscordantes) se planteen tener hijos. El lavado de semen se presenta como la opción de elección en estas parejas en las que el hombre es positivo al virus y quieren tener hijos biológicos. La técnica consiste en una selección astringente de los espermatozoides móviles y se apoya en la hipótesis de que los espermatozoides no son el principal reservorio del VIH y que éste se encuentra principalmente en el plasma seminal y en las células no espermáticas. El objetivo del trabajo es analizar la evidencia científica disponible en relación con la eficacia, efectividad y seguridad del lavado de semen en hombres VIH positivos para su uso en técnicas de reproducción humana asistida. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):28-38

Palabras clave: semen, espermatozoides, VIH, lavado, seropositivos

#### SUMMARY

The prevalence of HIV in patients at childbearing age along with increased life expectancy and quality resulting from the introduction of highly active antiretroviral treatments has meant that, increasingly, couples where only one of their members is HIV positive (serodiscordant couples) aim parenthood. Sperm washing is presented the most convenient option in these couples where the man is positive for the virus and want to have biological children. The technique consists in an astringent selection of motile sperm and is supported in the hypothesis that sperm are not the main reservoir of HIV, which is primarily found in seminal plasma and non-spermatid cells.

The aim of this study is to analyze the scientific evidence available regarding the efficacy, effectiveness and safety of sperm washing in HIV-positive men in assisted reproduction techniques. Rev Asoc Est Biol Rep 2012; 17(1):28-38

Key words: semen, spermatozoa, HIV, wash, seropositive

#### INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que se transmite por vía sanguínea, sexual o vertical (de madre a hijo), que afecta sobre todo a los linfocitos T, a los macrófagos y a las células del sistema nervioso central que tienen en común el receptor vírico (la molécula CD4) (Oliva y Pons, 2004).

El SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia humana) es la manifestación más grave de una gama de trastornos relacionados con el VIH. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) de los Estados Unidos definieron la enfermedad

en el año 1982 y desde entonces se han desarrollado diversas definiciones de SIDA y diversas clasificaciones de la infección basadas en la evidencia de la infección por el VIH y confirmación por el laboratorio. Actualmente, el sistema de clasificación se basa en características clínicas, inmunológicas y de diagnóstico de la infección por el VIH (Oliva y Pons, 2004).

En la actualidad existen más de 33 millones de personas infectadas, 20 millones de muertes y más del 80% de estos casos son por transmisión sexual (Halfon et al., 2010).

El objetivo de esta revisión es analizar la evidencia científica actualmente

disponible en relación con la eficacia, efectividad y seguridad del lavado de semen en hombres VIH positivos para su uso en técnicas de reproducción humana asistida.

#### EL VIRUS DEL VIH Y SU TRANSMISIÓN POR VÍA SEXUAL

Desde hace décadas, el VIH ha sido identificado en forma de virión (ARN) en el plasma seminal y en forma de provirus (ADN) en la fracción celular del eyaculado, conociéndose que los varones seropositivos para el VIH, pueden tener elevados niveles del retrovirus, ya sea en plasma seminal o en células no germinales (Semprini et al., 1992; Marina et al., 1998a).

Además, en relación a la carga viral y su comparación entre plasma sanguíneo y plasma seminal, los estudios sugieren que éstos se comportarían como compartimentos diferentes, por lo que el VIH puede seguir estando presente y con capacidad infectiva en semen aunque haya niveles indetectables en sangre (Ruibal y Larcher, 2009).

Los tratamientos con antirretrovirales reducen los niveles en sangre y plasma, pero aun así se pueden detectar niveles de ARN en el plasma seminal y de células infectadas no espermáticas, debido a que la difusión de los antirretrovirales a los compartimentos genitales es bastante variable ya que puede que no consigan penetrar porque las células germinales se encuentran protegidas mediante la barrera hemato-testicular que evita la entrada de ciertas sustancias, incluyendo numerosos fármacos (Williams et al., 2003).

La mayoría de las infecciones resultan de la exposición genital al semen de varones seropositivos, y el riesgo de infección depende del número de viriones y células infectadas, del número de veces que se entra en contacto con

el semen, la presencia de infecciones y lesiones genitales, la capacidad de infección del VIH, la susceptibilidad del hospedador y el tipo de práctica sexual (Marina et al., 1998b).

La transmisión horizontal en parejas estables es relativamente baja, resultando ser mucho más elevada en relaciones esporádicas con diferentes parejas sexuales. Sin embargo el riesgo de transmisión vertical de la madre al feto es mucho más elevado: un varón seropositivo puede infectar a su hijo a través de la madre pero no existe ninguna evidencia de transmisión del VIH de una madre no infectada a un hijo. El riesgo cuando ambos miembros son seropositivos es la reinfección con cepas distintas, que puede empeorar el estado de la enfermedad (Englert et al., 2001; Mencaglia et al., 2005).

En ausencia de precauciones en relaciones sexuales con parejas seropositivas, hombre seropositivo y mujer seronegativa, la transmisión del virus del hombre a la mujer se estima de 1 a 3 actos sexuales por cada 1.000 (Baker et al., 2003; Garrido et al., 2004; Mencaglia et al., 2005).

Existe mucha controversia acerca de la presencia o no de partículas víricas en los espermatozoides móviles, sobre todo fundamentada en datos ya obsoletos, que sembraron la duda acerca del uso de estos espermatozoides con fines reproductivos.

La presencia intracitoplasmática de VIH en varones seropositivos fue sugerida por Baccetti et al., (1990, 1991, 1994, 1998), Bagasra y Freund, (1990) y Bagasra et al., (1994) con la identificación de un receptor de VIH, diferente del CD4 de los linfocitos, presente en la membrana de los espermatozoides (Tabla I).

La presencia del VIH en el espermatozoide fue detectada también en el semen de varones seronegativos tras ser cultivado *in vitro* con el virus (Dussaix et al., 1993), aunque en 1998 el grupo de Kuji et al. no corroboró la presencia intraespermática del virus tras cultivo de espermatozoides *in vitro* con VIH (Tabla I).

Se demostró la presencia del virus en espermatogonias, espermatocitos e incluso en espermátidas (Nuovo et

**TABLA I.** ¿Infecta el VIH-1 al espermatozoide humano? MET: Microscopia electrónica de transmisión; HIS: Hibridación *in situ*; a Cultivo *in vitro* de muestras de semen de hombre seronegativo al VIH. Marina et al., 2002.

Autores	Técnicas	Resultado
Dussaix et al. (1993)	MET	SI
Baccetti et al. (1998)	MET	SI
Baccetti et al. (1994)	HIS	SI
Baccetti et al. (1998)	HIS	SI
Bagasra and Freund (1990)	HIS	Si
Baccetti et al. (1994)	Cultivo a	SI
Kuji et al. (1998)	Cultivo a	NO
Bagasra et al. (1994)	PCR <i>in situ</i>	ADN +
Quayle et al. (1998)	PCR <i>in situ</i>	NO
Nuovo et al. (1994)	PCR <i>in situ</i> en testes	ADN+
Baccetti et al. (1994)	PCR	ARN+
Marina et al (1998 <sup>a</sup> )	PCR	±
Dulouost et al. (1998)	PCR	±
Quayle et al. (1997)	PCR	-
Quayle et al. (1998)	PCR	-

al., 1994). Sin embargo, este estudio se realizó en testículos atrofiados de hombres que habían fallecido a causa del VIH, siendo ésta una situación que no puede ser extrapolable a casos de hombres con bajos recuentos virales y recuento espermático normal (Marina et al., 1998a).

Otros autores únicamente han detectado la presencia de VIH en el plasma seminal y/o en células no espermáticas presentes en el semen (linfocitos y macrófagos), pero no en gametos (Quayle et al., 1997). Defienden la ausencia total de partículas virales y ácidos nucleicos en el espermatozoide demostrando que la separación del fluido seminal y de células no espermáticas con la técnica de lavado propuesta por Semprini en 1992, reduce los niveles virales, mediante detección por PCR y nested-PCR (Semprini et al., 1992; Lasheeb et al., 1997; Quayle et al., 1997; Garrido et al., 2006; Garrido et al., 2009) (Tabla I).

Aunque no se ha podido demostrar que el VIH no se adhiere fuertemente al espermatozoide o lo infecte, la experiencia mostrada indica que, con la metodología descrita, el riesgo de transmitir el VIH con espermatozoides lavados es inferior (concretamente y hasta el momento, es un riesgo nulo) al observado en parejas serodiscordantes que efectúan coito no protegido (Marina et al., 2002).

En la actualidad no hay información convincente que señale que el espermatozoide pueda transmitir el retrovirus, pero los casos clínicos llevados a cabo mediante lavado seminal, nested-PCR e ICSI, muestran la efectividad del procedimiento sin que se haya producido ninguna seroconversión en madres ni en recién nacidos, en más de 3.000 ciclos de Inseminación Artificial e ICSI llevados a cabo por diferentes grupos de investigación.

## TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN VARONES SEROPOSITIVOS AL VIH

A los varones seropositivos para el VIH con parejas seronegativas, se les plantea la duda de la paternidad aunque sean fértiles y quieran ser padres, debido a que corren el riesgo de transmitir el virus a la mujer

a través del semen en la relación sexual sin protección con objeto de engendrar. El método natural de conseguir embarazo, conlleva este riesgo (Marina et al., 1998a; Chrystie et al., 1998; Marina et al., 2002).

Además, otro aspecto importante a resaltar es que no todas estas parejas pueden ser fértiles, y uno de los motivos, puede ser la edad. En la actualidad, todos los varones contagiados por vía parenteral a causa de toxicomanías, tendrían una edad cercana o superior a la cuarentena, y es probable que sus parejas en la actualidad también la tengan (Garrido et al., 2004). La repetición de coitos no protegidos, si es la elección, incrementa el riesgo de transmisión viral y el resultado es que la mujer se contagia del VIH y no queda embarazada (Marina et al., 2002), aunque sigue siendo un tema muy controvertido (Barreiro et al., 2007), y hay autores que defienden que en ciertas circunstancias y con la enfermedad controlada y el paciente infectado exhibiendo ciertas características clínicas, no hay que desestimar los métodos naturales.

En este caso, lo que hay que valorar es si las consecuencias derivadas de estos actos (mantener relaciones sexuales sin protección para lograr la paternidad), pudiéndose evitar mediante las técnicas de reproducción asistida con una seguridad prácticamente total, merecen querer evitar este tipo de tratamientos para lograr la paternidad.

En el comienzo de la epidemia, la presencia de virus en el semen y fluidos vaginales, la posibilidad de transmisión horizontal y vertical, la alta morbimortalidad de los futuros padres e hijos y el riesgo de transmisión al personal médico motivaron la negativa de los especialistas en reproducción asistida a realizar tratamientos de infertilidad en esta población (Ruibal y Larcher, 2009).

La introducción de los tratamientos antirretrovirales de gran actividad, TARGA, ha retrasado e incluso evitado la progresión del SIDA, consiguiendo alargar la supervivencia y la calidad de vida de las personas afectadas por el VIH (Englert et al., 2001; Baker et al., 2003; Oliva y Pons, 2004). Estos avances han hecho modificar el concepto de una enfermedad asociada a un rápido desenlace por el de

una enfermedad de desarrollo crónico, con una expectativa de vida parecida a la de otras patologías crónicas; por lo que muchos individuos seropositivos se plantean la posibilidad de tener descendencia (Mencaglia et al., 2005).

La consecuencia inmediata de esta situación es la necesidad de un consejo reproductivo positivo que no plantee, como antes, evitar a ultranza el embarazo en aquellas parejas en las que uno o ambos miembros sean seropositivos.

Hasta hace algunos años, a estas parejas se les recomendaba acogerse a los programas de fertilidad mediante donación de semen, adopción o incluso abandonar la idea de tener niños (Englert et al., 2001). Los avances en el conocimiento de la enfermedad y en el campo de la reproducción asistida, permiten desde hace décadas a las parejas en estas circunstancias formar familias y disminuir los riesgos al máximo (Ruibal y Larcher, 2009).

Las opciones que tienen las parejas serodiscordantes en las que el hombre es VIH positivo y la mujer es VIH negativo para poder tener descendencia están vinculadas al lavado de semen y posterior técnica de reproducción asistida con inseminación artificial o fecundación *in vitro* (FIV) para reducir el riesgo de transmisión con el uso de sus propios gametos (Baker et al., 2003).

Lo que permiten las técnicas de reproducción asistida es controlar las diferentes etapas del proceso reproductivo para que se disminuya al mínimo la posibilidad de exposición al virus y transmisión de éste entre ambos miembros de la pareja.

## LAVADO SEMINAL

El lavado de semen es una técnica que se realiza en algunos centros de reproducción asistida para separar los espermatozoides móviles del resto del semen y así eliminar o reducir al mínimo el riesgo de transmisión a la madre y al bebé. A continuación, estos espermatozoides se utilizan para la inseminación de la mujer mediante inseminación artificial (IA) o fecundación *in vitro* (FIV). Es necesario

disponer, antes de emplear este semen de manera segura, de pruebas moleculares diagnósticas fiables que confirmen la ausencia del virus en la muestra tratada.

Augusto E. Semprini fue el precursor de la técnica de lavado de semen y publicó en el año 1992 los primeros 29 casos de parejas serodiscordantes en las que se había realizado técnicas de reproducción asistida después del tratamiento del semen con lavado seminal, de las cuales 15 mujeres consiguieron llevar a término su embarazo sin ninguna seroconversión. Este procedimiento causó un gran interés y aumentó las esperanzas de muchas parejas que querían tener hijos sin el riesgo de que la mujer se infectara (Semprini et al., 1992; Garrido et al., 2006; Garrido et al., 2009)

Este tipo de tratamientos en la actualidad, gracias a los estudios realizados, son un programa totalmente establecido en diferentes clínicas de reproducción y países, y en el que se han alcanzado cotas de seguridad prácticamente definitivas, con unas probabilidades de éxito en la consecución de una gestación muy elevadas (Marina et al., 1998a).

La base que permitió este desarrollo, se sentó al localizar los reservorios del virus en el plasma seminal y en células no espermáticas, y por ello existe una enorme reducción

en el riesgo de transmisión con el uso de espermatozoides lavados y seleccionados antes de inseminarlos en la mujer (Baker et al., 2003).

Los partidarios de esta técnica se apoyan en la hipótesis de que el virus no esté presente en los espermatozoides, pero sí en el plasma seminal y en las células no espermáticas con receptores CD4 (linfocitos T y macrófagos) (Oliva y Pons, 2004).

La gran cantidad de nacimientos libres del VIH reportados hasta la actualidad son la demostración de esta teoría.

### PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DEL SEMEN

Aunque con diferentes variantes utilizadas en diferentes centros, la técnica de eliminación del VIH consiste en aplicar a la muestra de semen un doble proceso de lavado: el gradiente de densidad y el *swim up*.

Estas dos técnicas se utilizan habitualmente en reproducción humana para separar y seleccionar los espermatozoides móviles aptos para fecundación. La diferencia con el lavado de semen de pacientes VIH positivos es que se utilizan las dos técnicas de forma conjunta reduciendo así el riesgo de infección de manera considerable si lo comparamos con el de una pareja que intente concebir de manera natural (Oliva y Pons, 2004).

Las principales variaciones observadas entre los estudios son los diferentes porcentajes de gradientes de densidad, el tiempo y la fuerza de centrifugación, y la utilización de diferentes métodos de detección del VIH, aunque el espíritu del concepto parece homogéneo (Tabla II).

Algunos estudios identificados realizan diferentes gradientes discontinuos (Chrystie et al., 1998; Dulioust et al., 1998; Marina et al., 1998a; Meseguer et al., 2002), otros utilizan doble tubo de gradiente (Politch et al., 2004), otros no realizan *swim-up* (Dulioust et al., 1998) y la mayoría realizan la combinación de ambos métodos, gradientes de densidad y *swim-up* (Chrystie et al., 1998; Marina et al., 1998a; Meseguer et al., 2002). (Tabla II)

Prácticamente, todos los autores aplican la técnica con pequeñas variaciones, siguiendo al modelo propuesto por Semprini en 1992.

Técnicamente, guardando las precauciones necesarias en el laboratorio, los pasos a llevar a cabo incluirían:

- Un primer lavado añadiendo medio de cultivo al semen fresco en proporción 2:1. Se centrifuga y se extrae el sobrenadante. El sedimento se resuspende en medio de cultivo.
- *Centrifugación con gradientes de densidad*: la técnica consiste en formar diversas capas de diferentes

**TABLA II.** Técnicas de separación y detección del VIH en las muestras obtenidas por lavado de semen. PCR: polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; Nasba: Nucleic acid sequence-based amplification. Oliva y Pons, 2004.

Referencia	Técnica Separación	Técnica Detección
Semprini AE et al., 1992	Gradiente de centrifugación (Menezo B2) y swim-up	Inmunofluorescencia indirecta
Sauer MV et al., 2002	Gradiente de densidad doble (47% y 90% PureCeption) y swim-up.	Ninguna
ARN VIH-1		
Chrystie IL et al., 1998	Gradiente de doble densidad (Percoll, Nasba, Ficoll) + swim-up	
Politch JA et al., 2004	Gradiente de doble tubo de doble densidad (Isolate y Percoll)	RT-PCR; Nuclisens assay; Cultivo cuantitativo del VIH-1
ARN y ADN VIH-1		
Lasheeb AS et al., 1997	Gradiente de doble densidad (Percoll) + swim-up	Nasba; Nested PCR
Dulioust E et al., 1998	Gradiente de doble densidad (Percoll)	Nasba
Marina S et al., 1998	Gradiente de triple densidad (Percoll) + swim-up	PCR (Amplicor)
Meseguer M et al., 2002	Gradiente de triple densidad (PureSperm) + swim-up	Nested PCR

densidades. Para realizar los gradientes de densidad se utiliza una solución isotónica (Percoll®, PureSperm®, SpermFilter®, Ficoll®) y, en general (en el lavado estándar), se hacen tres capas de concentraciones al 50%, 70%, y 90% para separar las diferentes fracciones celulares del semen. A continuación, se pone la muestra de semen en la parte de arriba del tubo que contiene la preparación de gradientes y se centrifuga. Cada componente del semen empieza a bajar por el gradiente hasta que llega a la zona en que la densidad de la solución es igual a su densidad.

La velocidad a la que sedimenta cada uno de los componentes depende fundamentalmente del tamaño y de su forma. Los componentes más pequeños

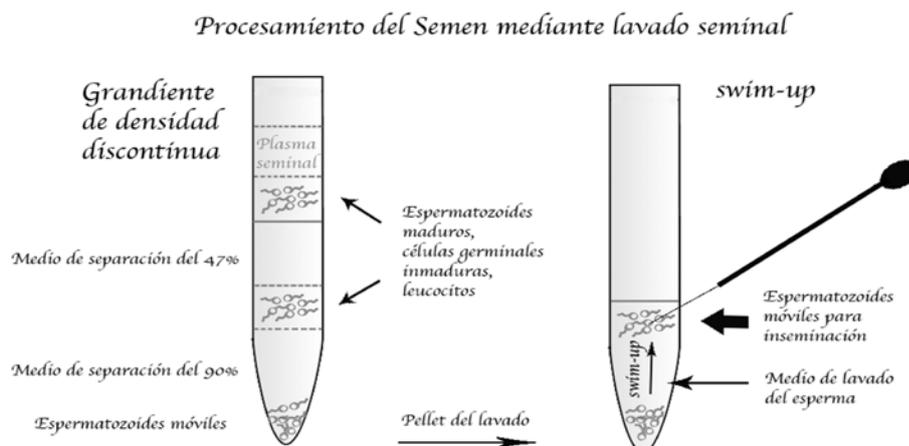
necesitan más fuerza de centrifugación y más tiempo para llegar a la capa de la misma densidad. Después de la centrifugación los espermatozoides móviles se localizan en la capa de más densidad, es decir, en el fondo del tubo. Para recuperarlos, se pueden ir sacando las capas superiores hasta llegar a la del 90% con la ayuda de diferentes pipetas o bien perforar el fondo del tubo para retirar el pellet por debajo (Figura 1).

- *Técnica de swim-up*: la técnica se basa en una selección de los espermatozoides móviles. El pellet recuperado con la centrifugación por gradiente de densidad se deposita en un tubo estéril con un medio de preparación del semen (por ejemplo human tubal fluid, o HTF), después se pone inclinado a 45° en la incubadora,

con una temperatura de 37°C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5% durante una hora. Pasado este tiempo se recoge el sobrenadante donde se encontrarán los espermatozoides móviles que habrán nadado desde el pellet. Del sobrenadante se recoge la parte superior y se deja en el tubo la parte en contacto con el pellet (Figura 1).

La muestra obtenida de espermatozoides se divide en varias partes. Una de ellas para valorarla mediante recuento de espermatozoides y movilidad, otra parte para determinar la presencia/ausencia del VIH con técnicas de biología molecular, y el resto para congelarla (si se le va a dar un uso posterior), o para realizar la técnica de reproducción asistida pertinente, siempre tras la confirmación de la ausencia del virus en la muestra lavada.

Figura 1



La utilización del 50% de los espermatozoides móviles recuperados con el lavado seminal para la detección con nested PCR permite extrapolar los resultados obtenidos a la otra fracción de la muestra que se utilizará para RHA, y así tener la seguridad de su uso evitando la transmisión.

Incluso en las últimas publicaciones de nuestro grupo, se ha descrito una modificación al método habitual para muestras con una ínfima cantidad de espermatozoides móviles, e incluso en muestras de biopsia testicular (Semprini et al., 1992; Garrido et al., 2006; Garrido et al., 2009).

## DETECCIÓN DE VIH

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus y tiene la capacidad de sintetizar la enzima Transcriptasa Reversa y convertir el ARN en ADN para introducirse en el genoma y así en la célula hospedadora. De manera general, los métodos de detección del VIH están basados en la amplificación de secuencias bien definidas de ácidos nucleicos virales.

A lo largo del tiempo se han utilizado diferentes técnicas con el fin de determinar la presencia o ausencia del virus (Tabla II). Los primeros informes de mujeres y recién nacidos no infectados

tras la realización del protocolo de lavado seminal e Inseminación Artificial, que fueron publicados en Italia, realizaban la detección del VIH mediante inmunofluorescencia para el antígeno p24 (Semprini et al., 1992).

Existen varios métodos comerciales para la determinación de la carga viral; HIV RNA PCR (Amplificor HIV-1 Monitor, Roche Molecular Systems), branched chain DNA o bDNA (Quantiplex HIV RNA Assay, Chiron), Nucleic acid sequence based amplification o NASBA (Nuclisense, Organon Teknika).

Las técnicas disponibles inicialmente (primera generación) detectaban

sólo a partir de 10.000 copias/ml. Las técnicas más utilizadas (segunda generación) tienen un límite inferior de detección de 200 a 400 copias (Oliva y Pons, 2004). El método de detección NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) es un método comercial (tercera generación) que incorpora una secuencia como sistema de control para demostrar la eficacia de la amplificación para cada muestra evaluada. Presenta una sensibilidad de 50 copias por reacción (Lasheeb et al., 1997). Aunque este método presenta un bajo límite de detección, el hecho de que una muestra procesada sea negativa, todavía no significa que esté libre de carga viral (Christie et al., 1998).

El método de detección más empleado es la PCR estándar. Consiste en la amplificación enzimática de secuencias específicas del material genético, y permite la cuantificación del ADN y del ARN del HIV de los espermatozoides móviles obtenidos del semen lavado (carga proviral y viral).

Los procedimientos de PCR estándar, como los empleados para la cuantificación de los niveles virales en sangre, cuando se utilizan para determinar los niveles virales en muestras de plasma seminal puede que no sean suficientes ya que existe un límite en el número de copias que puede detectar. La sensibilidad de la técnica es de 200 copias/ml de ARN y al menos 10 células infectadas. Es posible que unos pocos espermatozoides contengan VIH y no sean detectados, pero es imposible estar seguro al 100% ya que la PCR se aplica a una fracción de la muestra de espermatozoides y será la otra fracción la que se usará para la IA o FIV (Marina et al., 1998a).

El empleo de esta técnica puede dar lugar a la aparición de falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de la polimerasa, presentes en el semen, que bloqueen la reacción o a que el número de células o viriones esté por debajo de los niveles de sensibilidad de la técnica (Garrido et al., 2004).

En 2002, Sauer y colaboradores, publicaron un trabajo en el que afirmaban el incremento de seguridad que se conseguía mediante el uso de ICSI en

los protocolos de reproducción asistida en parejas serodiscordantes para el VIH. En la metodología de su protocolo, no estaba incluida la detección de partículas víricas del VIH en las muestras de semen tras el lavado, debido a que aseguraban que las técnicas de detección empleadas en los laboratorios presentaban una baja sensibilidad. Por este motivo, afirmaban que aunque se realizara una detección antes de la inseminación artificial, el procedimiento no estaba exento de riesgo ya que un pequeño número de partículas víricas podía haber quedado sin ser detectadas.

Este trabajo ha recibido varias críticas, que aseguraban que aunque las técnicas de detección no eran extremadamente sensibles, la solución no era dejar de realizarlas (Garrido et al., 2002). Aunque se reduzca la posibilidad de transmisión mediante el uso del ICSI, se debe realizar el método más seguro que dispongamos ya que está en juego la salud de las personas. En todos los casos se deben realizar pruebas para la detección del virus en las muestras de semen lavado y nunca deben utilizarse aquellas en las que aparezcan resultados positivos.

En la actualidad, la técnica que ha demostrado tener mayor sensibilidad para determinar la presencia/ausencia de ácidos nucleicos de VIH en espermatozoides lavados es la nested-PCR. Este método permite la detección de una única copia viral de ARN o ADN. Con la aplicación de este método de detección, se ha demostrado que muchas muestras que se consideraban negativas mediante el uso de métodos comerciales de detección, no estaban completamente libres de partículas virales (Garrido et al., 2002; Meseguer et al., 2002).

Sin embargo, no se ha publicado ninguna infección utilizando la PCR estándar a pesar de no ser el método más sensible existente, y este hecho podría estar asociado a que realmente, tan bajos niveles, y tan pocas exposiciones, podrían ser inocuos.

Se debe tener en cuenta que este tipo de procedimientos para ajustarse a las recomendaciones estándar para el tratamiento de muestras infecciosas, precisan además de un laboratorio

específico con componentes exclusivos para este tipo de muestras con objeto de evitar la aparición de nuevos casos de contaminación nosocomial durante los tratamientos de reproducción, así como el riesgo ocupacional para el personal sanitario expuesto.

### CALIDAD DEL SEMEN EN VARONES SEROPOSITIVOS

La calidad del semen puede estar afectada por la propia infección del VIH (Dondero et al., 1996; Dulioust et al., 2002; Garrido et al., 2005), también por los tratamientos antirretrovirales utilizados (Dulioust et al., 2002; Garrido et al., 2005), y en caso de utilizar técnicas de RHA para prevenir la transmisión horizontal, por el mismo proceso de lavado de semen (Oliva y Pons, 2004; Garrido et al., 2005).

El hecho de realizar el doble lavado para asegurar al máximo la eliminación del virus influye negativamente en la cantidad de espermatozoides disponibles para inseminar o para realizar la FIV. Es necesario que estos pacientes tengan una calidad seminal inicialmente alta ya que después del doble lavado se recupera un porcentaje bajo de los espermatozoides móviles que se encuentran en la muestra eyaculada, que puede rondar el 5% (Oliva y Pons, 2004; Garrido et al., 2005).

Las características seminales de varones seropositivos han sido objeto de muchos estudios a lo largo de los años. Diversos grupos han comparado muestras de semen procedentes de hombres seropositivos para el VIH con muestras de semen de hombres sanos o no infectados con el virus (Dondero et al., 1996; Dulioust et al., 2002; Garrido et al., 2005).

Algunos autores constataron cambios en el patrón de movilidad, volumen de eyaculado y en el número total de espermatozoides (Dondero et al., 1996; Lasheeb et al., 1997; Dulioust et al., 2002). Sin embargo, en un trabajo publicado en 2005 por nuestro grupo (Garrido et al., 2005), no se hallaron diferencias significativas entre los grupos, pudiéndose comparar todos los parámetros entre ellos y demostraron que estas variaciones no eran suficientemente marcadas para alterar gravemente la fertilidad (Tabla III).

**TABLA III.** Comparación de características seminales entre un grupo infectado por VIH y un grupo control. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. A, B, C, D= tipo A, B, C y D de movilidad; NTE =número total de espermatozoides progresivos; PL= tras lavado. Garrido et al., 2005.

Parámetros seminales	Control	VIH
	73	73
Volumen (ml)	3.4 $\pm$ 0.23	3.7 $\pm$ 0.2
Concentración (sperm/ml)	82.3 $\pm$ 11.2	78.4 $\pm$ 12.3
A	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
B	48.1 $\pm$ 3.2	45.1 $\pm$ 4.1
A + B	48.3 $\pm$ 3.8	45.3 $\pm$ 4.0
C	14.5 $\pm$ 302	14.3 $\pm$ 2.2
TMP ( $\times$ 106/eyaculado)	140.6 $\pm$ 12.0	136.1 $\pm$ 13.3
Volumen resuspendido (ml)	-	1.1 $\pm$ 0.1
Concentración TL (sperm/ml)	-	8.1 $\pm$ 0.4
A PL	-	4.6 $\pm$ 0.1
B PL	-	70.2 $\pm$ 2.6
A + B PL	-	73.6 $\pm$ 2.6
C TL	-	9.3 $\pm$ 1.6
NTE PL	-	8.9 $\pm$ 0.2
Recovery rate	-	4.5 $\pm$ 1

Los tratamientos con antirretrovirales, también han sido objeto de diversos estudios que comparan la calidad espermática, en varones con diferentes tratamientos de antirretrovirales (bi, tri o cuatriterapia) y varones que no hacen uso de ellos, que han demostrado que el uso o no de éstos no influye en la calidad, pudiéndose comparar los diferentes parámetros entre ambos grupos (Dulioust et al., 2002; Garrido et al., 2005) (Tabla IV).

Cada vez más, existe información acerca de que la calidad del semen no solo puede valorarse con el recuento espermático y la valoración de la movilidad. En este sentido, diversos factores moleculares en el espermatozoide han sido relacionados con la infertilidad masculina (Garrido et al., 2008).

Además, una forma indirecta de valorar la calidad del semen es mediante la evaluación de los embriones de él obtenidos, su calidad y su capacidad de llegar a formar blastocistos óptimos para su posterior implantación y

desarrollo. Esta metodología para valorar el semen fue llevada a cabo por Melo et al. (2009) en la que comparaban embriones procedentes de parejas serodiscordantes al VIH con el hombre infectado y embriones procedentes de parejas con infertilidad asociada la mayoría a factor tubárico, mediante la realización de ICSI en ambos grupos. Los principales resultados que obtuvieron fueron que las tasas de fecundación, división y las características embrionarias eran similares entre los 2 grupos, no hallando diferencias en el número medio de embriones óptimos en día 3. Cuando estos embriones se cultivaban hasta día 5 ó 6 se observó un aumento significativo en el bloqueo embrionario del grupo de embriones procedentes de parejas serodiscordantes, sin embargo el número de blastocistos óptimos en día 6 era comparable en ambos grupos. Además, no se encontraron diferencias en cuanto al número de embriones criopreservados y transferidos, la implantación, embarazo, embarazos múltiples o en las tasas de abortos involuntarios entre los grupos. Gracias

a todos estos resultados concluyeron que la infección de VIH en parejas serodiscordantes con el hombre infectado no genera un impacto significativamente negativo en el desarrollo del embrión o en el resultado del ICSI (Melo et al., 2009).

## PREDICCIÓN DEL RESULTADO DEL LAVADO SEMINAL

En la actualidad no existen suficientes datos que demuestren que determinados parámetros son capaces de pronosticar el éxito o fracaso del lavado seminal, ni de explicar el pequeño % de casos en los que este procedimiento da resultados positivos, obligando a repetir la técnica para conseguir obtener muestras de espermatozoides limpios de virus.

La aparición de resultados positivos puede ser debido a una incorrecta manipulación de la muestra durante el procedimiento de lavado dejando presente en la muestra células no espermáticas susceptibles de infección como son linfocitos y/o macrófagos (Marina et al., 2002).

**TABLA IV.** Resultados entre pacientes con VIH que reciben o no tratamiento antirretroviral. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. A, B, C, D= tipo A, B, C y D de movilidad; TM; PL= tras lavado. Garrido et al., 2005.

N= 73	Antirretroviral	No drugs
Volumen (ml)	3.9 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3
Concentración sperm (106/ml)	84.5 $\pm$ 9.3	71.8 $\pm$ 16.2
A movilidad	0.1 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0
B movilidad	47.5 $\pm$ 2.3	39.5 $\pm$ 4.3
(A + B) movilidad	47.7 $\pm$ 2.3	39.5 $\pm$ 4.3
C movilidad	13.8 $\pm$ 1.2	12.9 $\pm$ 1.6
Total sperm móviles pre-lavado	161.8 $\pm$ 23.8	103.6 $\pm$ 23.3
Volumen post-lavado	1.2 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 0.9
Concentración sperm (106/ml) post-lavado	92.3 $\pm$ 1.9	63.6 $\pm$ 2.1
A movilidad	0.1 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0
B movilidad	71.3 $\pm$ 3.1	69.1 $\pm$ 5.9
(A+B) movilidad	73.8 $\pm$ 73.4	70.7 $\pm$ 65.4
C movilidad	9.9 $\pm$ 1.9	10.2 $\pm$ 3.5
Total sperm móviles post-lavado	10.9 $\pm$ 2.6	43.1 $\pm$ 1.7
Recovery rate	45.6 $\pm$ 0.8	41.1 $\pm$ 1.0

La única información que en la actualidad se puede dar a los pacientes es la propia experiencia de los diferentes grupos de investigación, y parece ser, acumulando las diferentes evidencias, que la tasa de lavados positivos puede rondar, según grupos, entre el 1-5%. La influencia de las diferentes densidades de gradientes y volúmenes utilizados en el *swim-up*, tampoco tiene relevancia en los resultados de las pruebas de detección vírica del VIH (Garrido et al 2005).

#### PARÁMETROS SEMINALES E INFECCIÓN DE VIH

Los niveles de CD4 y el recuento viral en sangre son dos de los parámetros más relevantes en la descripción del estado de la enfermedad. La disminución de los niveles CD4 en sangre está relacionada de manera negativa con el tiempo de evolución de la enfermedad (Oliva y Pons, 2004).

Muchos grupos de investigación hallaron cambios en la concentración espermática en muestras de semen de varones infectados (Dondero et al., 1996; Lasheeb et al., 1997) en los que el volumen total del eyaculado disminuía a medida que aumentaba el tiempo de evolución de la enfermedad, incrementándose así la concentración total de espermatozoides hasta el punto de mantener ese número estable (Dulouost et al., 2002).

En 2005, nuestro grupo (Garrido et al., 2005) no observó cambios en las concentraciones espermáticas de las muestras procedentes de pacientes infectados, y además demostró que, a medida que evolucionaba la enfermedad, la movilidad espermática no se veía afectada.

Bajos recuentos de CD4 en sangre, junto a un tiempo largo de evolución de la enfermedad, son factores relevantes para la muestra, pero

son insignificantes para el proceso completo de lavado seminal (Garrido et al., 2005).

#### EL USO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL VS. INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA

La inseminación artificial ha sido el método a elegir en los tratamientos de reproducción asistida en parejas serodiscordantes desde hace varias décadas, si las pruebas ginecológicas de la mujer lo han permitido, y el recuento de espermatozoides móviles es suficiente (Semprini et al., 1992; Marina et al., 1998b; Garrido et al., 2004).

Sin embargo, existen diversos casos en los que no está indicado el uso de la inseminación artificial, como por ejemplo, mujeres seronegativas con obstrucción de trompas de Falopio, casos de baja calidad seminal o con un bajo número de espermatozoides totales tras el lavado seminal que

haga prever un muy bajo número de posibilidades con inseminación, o incluso en fallos repetidos en las inseminaciones artificiales realizadas.

En estos casos estaría recomendado el uso de ICSI o FIV (Marina et al., 1998b; Loutradis et al., 2001).

Aun así, es ampliamente debatida la pertinencia del ICSI incluso en casos no incluidos en los supuestos anteriores, aunque la realización de un ICSI sea económicamente más costosa que una inseminación artificial, tales como razones de seguridad y la relación efectividad-coste que compensan su utilización (Garrido et al., 2004), en lugar de realizar IAs.

Entre las ventajas que se argumentan para el uso de ICSI en lugar de IAs en pacientes serodiscordantes para el VIH como primera opción encontramos:

1. Disminuir el riesgo de infección con el uso de un único espermatozoide por ovocito, frente a los millones que recibe la mujer en un ciclo de inseminación artificial (Marina et al., 1998b; Loutradis et al., 2001; Sauer y Chang, 2002; Ruibal y Larcher, 2009).

2. No se cancelan ciclos si los lavados resultan positivos. Los espermatozoides pueden mantenerse congelados tras el lavado, haciendo posible la repetición de las pruebas de detección las veces que sea necesario hasta la obtención de resultados adecuados, debido a que la muestra se procesa antes de iniciar el ciclo.

3. Las tasas de embarazo son mucho más elevadas en ICSI, incluso tres veces más que con IA, reduciendo así el tiempo necesario para la concepción, con la consiguiente disminución de la ansiedad y estrés de la pareja sometida a este tipo de tratamientos y con ello la exposición viral con ciclos repetidos, sin tener en cuenta la capacidad de fecundación de la pareja a tratar (Mencaglia et al., 2005; Ruibal y Larcher, 2009).

4. Rentabilización de todo el lavado. Los espermatozoides lavados que resulten negativos, pueden ser utilizados en tantos ciclos como sean necesarios, sin

la necesidad de realizar nuevos lavados que incrementan el coste de todo el proceso.

5. No se necesita recuperar un número importante de espermatozoides para conseguir índices adecuados de embarazo post-lavado (Ruibal y Larcher, 2009).

Por estos motivos, la Inyección intracitoplasmática (ICSI) es el procedimiento más recomendado y más seguro utilizado hasta el momento, debido a que se disminuyen mucho las posibilidades de transmisión del VIH y se maximizan las tasas de embarazo en parejas serodiscordantes.

La evidente desventaja del ICSI frente a la inseminación en estos casos es, por supuesto, los efectos secundarios asociados a este tipo de procedimientos en las mujeres. Ni siquiera los aspectos económicos son aquí favorables a las inseminaciones: si bien es cierto que el coste del ICSI es muy superior, la razón coste/efectividad, medida como el coste de lograr un niño sano en casa, es muy comparable, atendiendo a que se necesitan aproximadamente 3 ciclos de inseminación para lograr unas tasas de gestación acumuladas semejantes a las de ICSI.

## ASPECTOS ÉTICOS Y SOCIALES

El lavado de semen, como técnica añadida a las propias de Reproducción Humana Asistida (RHA), y con la finalidad de reducir al máximo el riesgo de transmisión o contagio horizontal a la pareja genera, como otras tecnologías médicas, dilemas éticos y sociales de distinta forma.

Hechos como que los pacientes infectados con el VIH han pasado a tener un curso crónico de la enfermedad y que buena parte de estos enfermos están en la edad propia de la reproducción, han originado un aumento del afán reproductivo y la necesidad de tecnologías que eviten el contagio (lógicamente, el preservativo, a la vez que ayuda a prevenir el contagio, anula cualquier probabilidad de embarazo) y, por lo tanto, se tiene que recurrir al lavado de semen y a alguna de las

diferentes técnicas de RHA (Oliva y Pons, 2004).

Las tecnologías de RHA, en esta situación de parejas serodiscordantes que quieren tener un hijo biológico, responden a la necesidad de prevenir el contagio y no tanto a problemas de infertilidad.

Las razones esgrimidas para negar las técnicas de reproducción asistida a estas parejas son en síntesis dos: riesgo de que el niño quede huérfano y de contagiar a la mujer y, por ende, al hijo. Pero el periodo de supervivencia, es decir, el tiempo entre la aparición de síntomas de SIDA y la muerte, se ha alargado debido al mejor control de las infecciones oportunistas y a la mayor eficacia de la terapia antirretroviral.

Actualmente no se puede afirmar que toda persona infectada de VIH morirá de SIDA. Y el contagio de hombre infectado a mujer seronegativa se puede reducir mediante técnicas de lavados de semen y reproducción asistida (Englert et al., 2001).

En el año 2001 aparece un editorial titulado "VIH e infertilidad: tiempo de tratar" (Gilling-Smith et al.) en el cual se esgrimen argumentos que dan lugar al debate y a la concienciación del problema. En dicho editorial se sostiene que no existe justificación para negar tratamiento a padres que son VIH positivos: el uso juicioso de la terapia antirretroviral en el embarazo y parto, el nacimiento por cesárea y el evitar la lactancia son medidas probadas que disminuyen el riesgo de transmisión vertical a menos del 2%.

El riesgo de malformaciones congénitas de un recién nacido de madre VIH negativa es de un 2.5% y éste se incrementa 4 veces si la madre es diabética insulino dependiente y 10 veces si tiene una malformación congénita significativa.

Desde la mirada actual de la enfermedad como un padecimiento crónico en el cual la expectativa de vida desde el momento del diagnóstico, en pacientes que reciben tratamiento, supera los 20 años, se pone de relieve la necesidad

de buscar opciones reproductivas para estos pacientes. El potencial de las personas VIH positivas de tener hijos no afectados y de no transmitir la enfermedad a sus parejas ha mejorado sustancialmente, aunque el éxito no está garantizado.

Los autores concluyen que las parejas en que uno o ambos miembros estén infectados deberían tener acceso a los mismos consejos y tratamientos que pacientes no infectados para permitirles concebir con un riesgo mínimo de contagio.

No se debe olvidar que pueden discutirse otras alternativas con las parejas como la adopción, no tener hijos o la donación de semen (Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2002; Ruibal y Larcher, 2009).

Respecto del VIH y el personal de salud, si se toman las medidas estándar universales para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas, el riesgo para la transmisión de VIH al personal es muy pequeño, y no es en sí mismo razón suficiente para negar servicios reproductivos a los infectados y sus parejas (Chrystie et al., 1998; Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2002; Ruibal y Larcher, 2009).

## CONCLUSIONES

En la actualidad, podemos afirmar que el semen es un vehículo de transmisión de la infección por el VIH, aunque su presencia dentro del espermatozoide o en las células germinales es un tema muy controvertido que todavía está por resolver. El lavado seminal, nested-PCR e ICSI, son los procedimientos más adecuados para reducir el riesgo de transmisión del VIH en parejas serodiscordantes con el hombre infectado, que quieren tener hijos, independientemente de su fertilidad y por ello la mayoría de los autores revisados indican la necesidad de utilizar sólo para RHA las muestras con resultado de la PCR negativo (tanto del ADN como del ARN).

Aunque no podemos demostrar que el VIH no se adhiera fuertemente al espermatozoide o lo infecte, la experiencia mostrada comienza a indicar que, con la metodología descrita, el riesgo de transmitir el VIH a través de espermatozoides lavados es inferior (cero por el momento) al observado en parejas serodiscordantes que efectúan coito no protegido. Además, los resultados de esta revisión muestran que la técnica del lavado de semen en hombres seropositivos al VIH para su uso en técnicas de reproducción asistida no ha producido ninguna seroconversión horizontal (a la mujer) ni vertical (al hijo) al virus.

Por tanto, a la pregunta formulada en el título de esta revisión, la respuesta es: para los varones infectados con VIH, que pretenden tener hijos, desde el punto de vista reproductivo, está todo resuelto: se conoce la vía de transmisión, se dispone de técnicas seguras para evitarla, la calidad del semen no resulta perjudicada por la infección, y el uso de sus espermatozoides en técnicas de reproducción asistida presenta una altísima probabilidad de éxito con riesgos despreciables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG. Spermatozoa of patients with AIDS contain HIV particles. In: Melica F, editor. AIDS and human reproduction. New York: Karger, 1990:47-54.

Baccetti B., Benedetto A., Burrini, A.G et al. HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. J. Submicr. Cytol. Pathol 1991; 23, 339-345.

Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG et al. HIV-particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. J Cell Biol 1994; 127; 903-914.

Baccetti B, Benedetto A, Collodel G, et al. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes. J Reprod Immunol. 1998; 41(1-2):41-67.

Bagasra O, Freund M. *In vivo* and *in vitro* studies of HIV-1 and human sperm. In: Alexander NJ, Gebelnick HL, Spieler JM.

Heterosexual Transmission of AIDS. New York: Wiley-Liss, 1990; 155-66.

Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, et al. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1 infected men. AIDS 1994; 8:1669-74.

Baker H, Mijch A, Garland S, et al. Use of assisted reproductive technology to reduce the risk of transmission of HIV in discordant couples wishing to have their own children where the male partner is seropositive with an undetectable viral load. Journal of Medical Ethics 2003; 29:315-320.

Barreiro P, Castilla JA, Labarga P, Soriano V. Is natural conception a valid option for HIV-serodiscordant couples? Hum Reprod. 2007 Sep;22(9):2353-8. Epub 2007 Jul 19

Chrystie IL, Mullen JE, Braude PR, et al. Assisted conception in HIV discordant couples: evaluation of semen processing techniques in reducing HIV viral load. Journal of Reproductive Immunology 1998; 41,301-306.

Dondero F, Rossi T, D'Offizi G, et al. Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection. Hum Reprod 1996; 11,765-768.

Dulioust E, Tachet A, De Almeida M, et al. Detection of HIV-1 in seminal plasma and seminal cells of HIV-1 seropositive men. Journal of Reproductive Immunology. 1998; 41, 27-40.

Dulioust E, Du AL, Costagliola D, et al. Semen alterations in HIV-1 infected men. Hum Reprod 2002; 17, 2112-2118.

Dussaix E, Guetard D, Dauguet C, et al. Spermatozoa as potential carriers of HIV. Res Virol 1993; 144,187-195.

Englert Y, Van Vooren JP, Place I, et al. ART in HIV-infected couples. Hum Reprod 2001; 16, 1309-1315.

Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Human immunodeficiency virus and infertility treatment. Fertil Steril 2002; 77,218-222.

Garrido N, Meseguer M, Bellver J. *In vitro* fertilization with intracytoplasmic sperm injection for human immunodeficiency

virus-1serodiscordant couples. Am J Obstet Gynecol 2002; 187, 4

Garrido N, Meseguer M, Bellver J, et al. Report of the results of a 2 year programme of sperm wash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. Hum Reprod 2004; 19, 2581–2586.

Garrido N, Meseguer M, Remohí J, et al. Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C (HCV) seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. Hum Reprod 2005; 20, 1028–1034.

Garrido N, Remohí J, Pellicer A, et al. The effectiveness of modified sperm washes in severely oligoasthenozoospermic men infected with human immunodeficiency and hepatitis C viruses. Fertil Steril. 2006 ;86(5), 1544-6. .

Garrido N, Remohí J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. Reprod Biomed Online. 2008 Dec;17(6):855-65.

Garrido N, Gil-Salom M, Martínez-Jabaloyas JM et al., First report of the absence of viral load in testicular sperm samples obtained from men with hepatitis C and HIV after washing and their subsequent use. Fertil Steril, 2009; 92(3), 1012-5.

Gilling-Smith C, Smith JR, Semprini, AE. HIV and infertility: time to treat. BMJ 2001; 322:566-567

Halfon P, Giorgetti C, Khiri H, et al. Semen May Harbor HIV Despite Effective HAART: Another Piece in the Puzzle. PLoS ONE 2010; 5(5): e10569.

Kuji N, Tanaka H, Takahashi J, et al. Elimination efficiency of HIV from semen by Percoll continuous density gradient-swim-up. Hum Reprod 1998; 13 (Abstract book): 131.

Lasheeb AS, King J, Ball JK, et al. Semen characteristics in HIV-1 positive men and the effect of semen washing. Genitourin Med 1997; 73, 303–305.

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, et al. Birth of two infants who were seronegative for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) after intracytoplasmic injection of sperm from HIV-1 seropositive men. Fertil Steril 2001; 75,210–212.

Marina S, Marina F, Alcolea R, et al. Human immunodeficiency virus type 1-serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. Fertil Steril 1998a; 70, 35–39.

Marina S, Marina F, Alcolea R, et al. Pregnancy following intracytoplasmic sperm injection from an HIV-1-seropositive man. Hum Reprod 1998b; 13, 3247–3249.

Marina S, Marina F, Expósito R, et al. HIV y reproducción asistida. Reproducción Asistida en parejas serodiscordantes (hombre seropositivo) al VIH-1: experiencia de 118 niños nacidos sanos. Ginecología y Obstetricia Clínica 2002; 3 (3):146-150

Mencaglia L, Falcone P, Lentini G.M, et al. ICSI for treatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-serodiscordant couples with infected male partner. Hum Reprod 2005; 20, (8): 2242–2246, 2005

Melo MA, Meseguer M, Bellver J, et al. Human immunodeficiency type-1 virus (HIV-1) infection in serodiscordant couples (SDCs) does not have an impact on embryo quality or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. Fertility and Sterility, 2009; 89, (1)

Meseguer M, Garrido N, Gimeno C, et al. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. Fertil Steril 2002; 78, 1199–1202.

Nuovo GJ, Becker J, Simsir A, et al. HIV-1 nucleic acids localize to the spermatogonia

and their progeny. A study by polymerase chain reaction *in situ* hybridization. Am J Pathol 1994; 144:1142-8.

Oliva G, Pons JMV. Lavado de semen en parejas VIH serodiscordantes para su uso en técnicas de reproducción humana asistida. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques. CatSalut. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. Septiembre de 2004.

Politch JA, Xu C, Tucker L, et al. Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method *versus* other methods. Fertil Steril. 2004; 81(2):440-7.

Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, Anderson DJ. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. J Infect Dis 1997; 176:960–8.

Quayle AJ, Xu Ch, Tucker L, et al. The case against an association between HIV-1 and sperm: molecular evidence. J Reprod Immunol 1998; 41: 127-36.

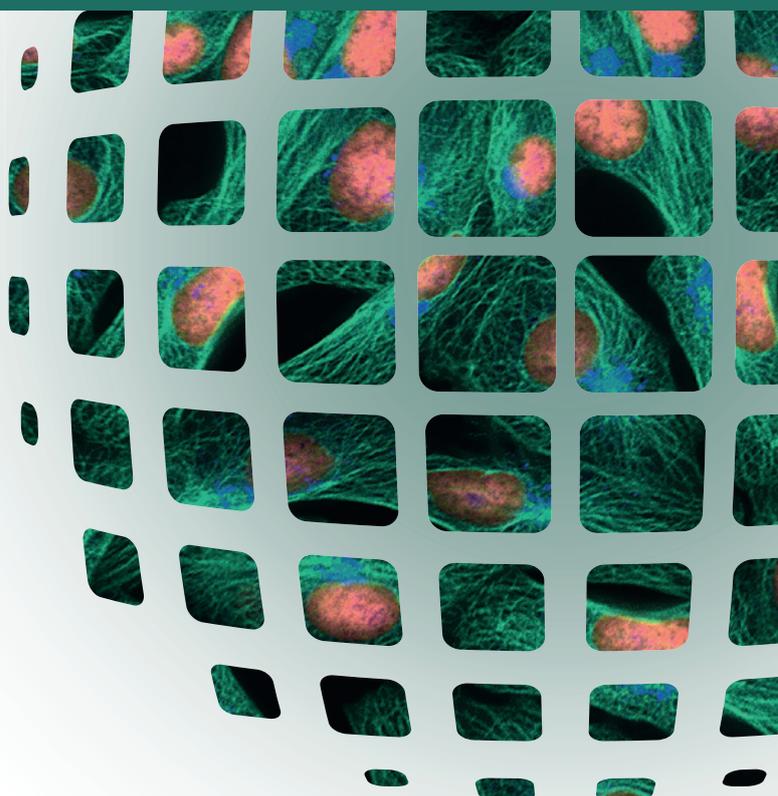
Ruibal M, Larcher JS .Riesgo de transmisión del HIV en parejas serodiscordantes en tratamiento de fertilidad. Reproducción 2009; 24: 115-127

Sauer MV, Chang PL. Establishing a clinical program for human immunodeficiency virus 1- seropositive men to father seronegative children by means of *in vitro* fertilization with intracytoplasmic sperm injection. Am J Obstet Gynecol 2002; 186: 627- 33.

Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, et al. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. Lancet 1992; 340, 1317–1319.

Williams CD, Finnerty JJ, MD, et al. Reproduction in couples who are affected by human immunodeficiency virus: Medical, ethical and legal considerations. Am J Obstet Gynecol 2003; 189(2):333-341.

- Esterilidad
- Reproducibilidad
- Seguridad



## ¡Nos preocupamos por sus células!

Soluciones para aplicaciones en manejo de células

**Si sus cultivos celulares son críticos en el éxito de su trabajo, entonces usted sabe que trabajar con células requiere el máximo cuidado.**

Tanto si trabaja en investigación en biología funcional, como en el desarrollo de nuevos fármacos o en aplicaciones clínicas, Eppendorf le proporciona el equipo preciso para ayudarle a obtener resultados fiables, trabajar de forma más productiva y alcanzar el éxito.

- Preservando la esterilidad y evitando las contaminaciones con nuestro consumible de alta calidad.
- Minimizando el tiempo que sus células están expuestas a condiciones no fisiológicas gracias a nuestros sistemas de conservación.
- Proporcionando equipamiento preciso y fiable para trabajar con sus células, como nuestras estaciones automáticas o nuestros sistemas de micromanipulación.

Para información más detallada visite:  
[www.eppendorf.com/ecc](http://www.eppendorf.com/ecc)

**eppendorf**

*El Debate del presente número es: “¿Es el Time-Lapse el futuro del laboratorio de reproducción asistida?”. Esta nueva aplicación se ha propuesto como un paso más en la búsqueda del embrión óptimo. En el próximo número de diciembre, el tema de debate será “¿Por qué los socios de ASEBIR participan tan poco en los temas de debate de nuestra revista?”. La oportunidad de expresar su opinión sobre un tema específico, de forma libre, no es aprovechada por los socios como se esperaría. Os recordamos que los temas de debate son permanentes, con lo cual, podéis opinar sobre ellos en cualquiera de los números.*

## EL EMBRYOSCOPE HA REVOLUCIONADO LOS SISTEMAS DE INCUBACIÓN

Nuria Fosas Saenz y Fernando Marina Rugero  
Instituto de Reproducción CEFER. Barcelona.  
www.institutocefer.com

A lo largo de los años se han producido mejoras en el sistema de incubación. Se ha intentado que la recuperación de la temperatura sea más rápida y que se disminuya la pérdida de CO<sub>2</sub>, es decir, conseguir un mejor equilibrio. Lejos quedan los incubadores de gran capacidad (100 l) de 1 sola puerta donde se realizaban los cultivos embrionarios humanos. El EmbryoScope ha surgido como un incubador de pequeño volumen con un tiempo de recuperación muy corto para los gases y la temperatura. Crea un ambiente estable y controlado que mejora el desarrollo embrionario. Además, proporciona un innumerable registro de imágenes.

El EmbryoScope permite que la placa con los embriones encaje perfectamente en el soporte. El calor se transmite directamente a la placa y el ambiente térmico es más estable. La placa está diseñada con unas aletas que garantizan un agarre firme y un manejo seguro para la manipulación de los embriones. La cantidad de medio usado es mínima (se necesitan 25µl de medio en cada pocillo).

Durante años los embriólogos hemos estado evaluando los embriones fuera del incubador y limitándonos a breves instantáneas de su división celular para minimizar cambios en el cultivo. Una gran ventaja de este revolucionario incubador es que no requiere la extracción de los embriones fuera de éste para poderlos chequear. El tiempo de observación es ilimitado y compartido con varios observadores. A través de una cámara integrada, se realiza una monitorización continua con la adquisición de imágenes en múltiples planos focales y en distintos intervalos de tiempo, con el resultado de un registro cinematográfico. La gran cantidad de datos que están disponibles a través de las imágenes nos ayudan a conocer el desarrollo del embrión minuto a minuto. Esto nos permite obtener más información y aumentar las posibilidades de detectar anomalías morfológicas.

El trabajar con esta tecnología supone un esfuerzo añadido para el embriólogo, que necesita dedicar más

tiempo a evaluar toda la información que se genera. También, se requiere un proceso de adaptación para la manipulación de los embriones dentro de estos pequeños pocillos.

La selección embrionaria ha ganado la ventaja de añadir nuevos parámetros morfocinéticos junto a las características morfológicas que teníamos hasta ahora para poder escoger el embrión con mayor probabilidad implantatoria. Ahora podemos comprobar, por ejemplo, que los embriones procedentes de hombres con más de 50 años, alcanzan el estadio de tres células significativamente antes que los de hombres menores de 50 años, o que los embriones de donantes cuya respuesta superó los 20 ovocitos tardaban más en llegar al estadio de 2 células. Se abren nuevas opciones de crear nuevos marcadores para poder realizar una mejor selección embrionaria.

## ¿EL FUTURO DE LA REPRODUCCIÓN SON LOS INCUBADORES CON UN SISTEMA DE TIME-LAPSE?

Alberto Tejera y Marcos Meseguer  
Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia

Hasta hace relativamente poco, el único método de evaluación embrionaria era el microscopio invertido, revelando información valiosa acerca de las características morfológicas y correlacionándose de forma positiva

éstas con las tasas de gestación e implantación (Van Royen et al. 1999). Se iniciaron en la década anterior nuevos estudios sobre métodos de selección basados en técnicas no invasivas que aportaran algo más

que la mera observación morfológica obtenida a través del microscopio. En concreto, se propone el “timing” en que se producen las distintas divisiones como método predictivo de la viabilidad embrionaria (Mio and Maeda, 2008).

Con estos antecedentes iniciamos una nueva línea de trabajo a través del desarrollo conjunto de una nueva plataforma de sistema *time-lapse*, denominada *embryoscope*®. Nuestro objetivo fue a partir de un incubador con microscopio incorporado generar un instrumento de trabajo clínico con múltiples aplicaciones.

Empezando por algo tan básico como probar el sistema de incubación publicamos nuestro primer trabajo (Cruz et al., 2011) dividiendo la mitad de la cohorte embrionaria entre un incubador convencional y el sistema de *time-lapse*, demostrando similar calidad embrionaria en ambos sistemas e incluso mayor porcentaje de embriones con llegada a blastocisto.

Superado este primer test en un estudio retrospectivo con un total de 487 parejas sometidas a fecundación *in vitro*, generados un total de 3630 embriones y con 885 de éstos transferidos, nos centramos en 467, ya que en estos embriones conocíamos con exactitud la implantación final; 100% de implantación (n=111) o bien 0% implantación (n=356). Entre las observaciones más importantes pudimos comprobar la existencia de unos rangos óptimos de tiempo con buen pronóstico implantatorio si las divisiones embrionarias se producían dentro de éstos. Observamos por ejemplo que dependiendo del momento en que el embrión alcanzaba 5 células, si éste lo alcanzaba entre las 48.8-56.6 horas post-ICSI la tasa de implantación subía un 25% en comparación con aquellos embriones que alcanzaban este número fuera del rango propuesto (Meseguer et al., 2011). Otras variables analizadas muy importantes fueron los intervalos entre las divisiones embrionarias o la sincronía en la división entre las blastómeras; éstas tenían un fuerte efecto sobre el potencial implantatorio. También observamos relaciones directas entre la tasa de llegada a blastocisto y los tiempos de los eventos importantes, matizando algunos de los resultados publicados por Wong et al. (2010) que resultan ser menos evidentes que los descritos y con un número de blastocistos analizados más relevante (cercano al millar).

Hemos ampliado considerablemente nuestros conocimientos en embriología básica con más de 10000 embriones analizados en nuestra base de datos de *time-lapse*. Con ellos podemos desmontar muchas afirmaciones asociadas a la embriología, algunas de ellas sin fundamento o cercanas a la mitología y que incluso han sido propuestas en consenso por asociaciones científicas nacionales e internacionales. Por ejemplo, el dinamismo de la puntuación pronuclear (variable según el momento de evaluación) o los tiempos medios de las divisiones que nos dicen por ejemplo que un embrión suele alcanzar las 8 células a la 1 a.m. en el día 3 de desarrollo, mucho antes de que los evaluemos en el laboratorio y que hace totalmente injustificada su evaluación tardía.

Con una experiencia de más de 2000 ciclos realizados por el sistema de *time-lapse*, podemos afirmar que mejoramos el éxito reproductivo de las pacientes. Por un lado, un sistema de *time-lapse* puede mejorar el potencial implantatorio de un embrión, ya que, durante el cultivo embrionario hasta 72 horas o incluso más, no necesitamos cambiar el medio de cultivo, no necesitamos sacar los embriones del incubador para evaluarlos en el microscopio convencional, y por lo tanto no variamos las condiciones de cultivo (esenciales para un buen desarrollo embrionario). Por otro lado, la selección embrionaria será más objetiva, pues aparte de la morfología embrionaria convencional, tendremos información adicional que nos ayuda a mejorar la selección, especialmente en aquellos casos con mucha igualdad en la cohorte embrionaria, ya que añadimos un algoritmo de selección aparentemente más resolutivo.

Retrospectivamente, hemos demostrado un aumento en las tasas de embarazo evolutivo superiores al 7%. Prospectivamente hemos iniciado un estudio randomizado (clinicaltrials.gov 2/22/2012), cuyos resultados preliminares apuntan en esa dirección, aunque serán necesarios más de 500 ciclos por rama para demostrar científicamente la mejora. Además,

disponemos de una herramienta potente de control de calidad en el laboratorio de embriología, aumentando la proyección científica de nuestro trabajo al darle un valor añadido. Definitivamente el futuro de la reproducción incluirá cultivo embrionario con sistema *time-lapse*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, Munoz M and Meseguer M. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by *time-lapse* imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:569-573.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB and Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-2671.

Mio Y and Maeda K. *Time-lapse* cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:660.e1-660.e5.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W and Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999;14:2345-2349.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM and Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115-1121.

## CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO. ¿HAY QUE PONER LÍMITES AL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL?

Dolores Tuñón, Mònica Parriego  
Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

Se estima que aproximadamente un 5-10% de los cánceres de mama y/o ovario son de tipo hereditario (CMOH). Se han identificado dos genes de alta penetrancia responsables de la predisposición al cáncer de mama/ovario de origen genético: BRCA1 (17q21) y BRCA2 (13q12). En enfermedades de herencia multifactorial como el CMOH, la presencia de la mutación no implica que sea inevitable su aparición, pero sí aumenta significativamente la probabilidad de desarrollarla. En mujeres portadoras, el riesgo de padecer cáncer de mama cuando se es portadora de una mutación en estos genes se sitúa entorno a un 50-85% y de padecer cáncer de ovario entre un 20-50%. Sin embargo, los varones portadores aunque tienen un riesgo de padecer cáncer de mama superior al resto de la población masculina, éste resulta muy inferior al observado en mujeres (1-6%). Las mutaciones en estos genes se encuentran en la línea germinal, heredando la primera mutación del progenitor portador mediante un patrón autosómico dominante con penetrancia incompleta. El desarrollo de la neoplasia vendrá determinado por la aparición de una nueva mutación en el alelo sano.

Los tumores de CMOH se caracterizan por una elevada tasa proliferativa y tienen tendencia a desarrollarse de forma precoz. A día de hoy, la efectividad de las opciones terapéuticas disponibles aún son limitadas y algunas de ellas muy agresivas. El hecho de que

no existan tratamientos preventivos eficaces para evitar el desarrollo de la enfermedad implica que las opciones terapéuticas de estas pacientes pasen por someterse a exámenes periódicos exhaustivos desde edades tempranas con el fin de detectar la aparición de la enfermedad lo antes posible. Éstos incluyen autoexploraciones mamarias mensuales a partir de los 18 años, mamografías anuales a partir de los 25 años, incluyendo resonancia magnética mamaria. Para el cáncer de ovario, aunque es difícil de detectar precozmente, se aconsejan dos ecografías ginecológicas anuales con determinación de marcadores tumorales. La cirugía profiláctica (mastectomía bilateral y/o salpingo-ovariectomía) es la medida preventiva disponible aunque resulta una alternativa agresiva y para que resulte eficaz hay que realizarla de manera precoz. Hay que recordar que si bien es cierto que la mortalidad por cáncer de mama se ha reducido en los últimos años, no se observa la misma disminución en los casos de cáncer de ovario. Todo ello implica importantes connotaciones negativas tanto a nivel físico como psicológico en las pacientes portadoras.

Equipos multidisciplinares integrados por genetistas, psicólogos y ginecólogos deben facilitar un correcto asesoramiento genético a parejas portadoras con deseo reproductivo. Éstas han de conocer el riesgo y tipo de cáncer que pueden padecer, las acciones para su detección, el tratamiento y

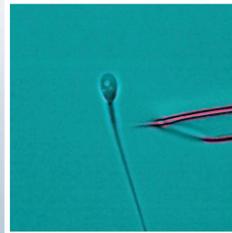
pronóstico, así como las opciones reproductivas de que disponen para eludir su transmisión a la descendencia. Las experiencias y el sufrimiento vivido por muchas mujeres y sus familias han hecho que parejas conocedoras de su condición genética decidan no tener descendencia ante el miedo de tenerles que someter a monitorizaciones continuas, generándoles preocupación al conocer su condición genética. El DGP se presenta en estos casos como una alternativa atractiva dando lugar a embarazos libres de mutaciones en BRCA, evitando abortos no deseados tras la realización de diagnóstico prenatal para el CMOH. El hecho de que los portadores de la mutación no siempre lleguen a desarrollar un cáncer de mama y/o ovario no debería ser significativo para negar la realización de un ciclo de diagnóstico genético preimplantacional (DGP), ya que el riesgo es muy elevado y, de momento, las alternativas terapéuticas son limitadas y el desgaste psicológico muy importante. Las vías para poder realizar el diagnóstico genético preimplantacional deberían ser más accesibles y permisivas por parte de las autoridades, sin necesidad de una autorización expresa caso a caso. Si en un futuro la prevención, el tratamiento y el pronóstico de esta enfermedad mejoran, el DGP en portadoras de mutaciones en BRCA ya no sería necesario, puesto que el futuro de su descendencia no estaría tan seriamente comprometido.



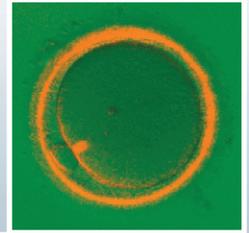
Alarma



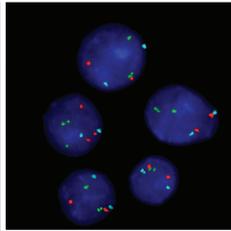
IMSI



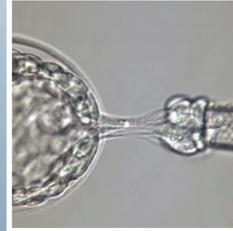
Polarización



Time-lapse



FISH



Biopsia TFE

# Think Quality

## ■ Herramientas de precisión

Sistemas de microscopía para observación y micromanipulación

## ■ Control permanente de parámetros

Condiciones de cultivo estables en un entorno controlado

## ■ Selección de los mejores candidatos

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

## ■ Mejores decisiones

Haga un mejor análisis teniendo toda la información

# OLYMPUS

Your Vision, Our Future

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

## MEDIOS DE CULTIVO PARA FECUNDACIÓN IN VITRO: ¿QUÉ LES FALTA PARA SER PERFECTOS?

### **CULTURE MEDIA FOR IN VITRO FERTILIZATION: WHAT ELSE DO THEY NEED TO BE PERFECT?**

Pilar Coy

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia.

email: pcoy@um.es

#### RESUMEN

Actualmente, los medios de cultivo que se emplean en los tratamientos de reproducción asistida humana los proporcionan diferentes casas comerciales especializadas que, en mayor o menor medida, nos informan sobre la composición cualitativa de los mismos, sin ofrecer apenas datos cuantitativos. Este hecho contrasta enormemente con la situación que encontramos en los laboratorios dedicados a la reproducción en diferentes especies de animales, en su mayoría mamíferos, cuyos datos sirven o al menos deberían servir, tras los correspondientes ensayos clínicos, para mejorar la eficacia de los medios empleados en la especie humana. El papel de los embriólogos humanos en este campo podría adquirir una gran relevancia a nivel investigador si ellos, como especialistas que se enfrentan diariamente a la manipulación y el cultivo de los gametos o embriones, dispusieran de la información necesaria para poder valorar el efecto de los diferentes componentes de los medios de cultivo sobre el éxito del proceso reproductivo. Para ilustrar esta idea, este artículo presenta algunos ejemplos de moléculas con efecto beneficioso en la fecundación de diferentes modelos animales que no están actualmente presentes en los medios de cultivo humanos. Asimismo, revisa algunos aspectos sobre la composición actual de los medios de cultivo comparándolos con los correspondientes fluidos fisiológicos que pretenden imitar. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2012; 17(1):44-52

Palabras clave: medios de cultivo, fluido oviductal, modelos animales, fecundación.

#### SUMMARY

Currently, the culture media used in human assisted reproduction treatments are provided by different specialized commercial firms. They report, to a greater or lesser extent, on the qualitative composition of the media, but they do not offer quantitative data. This contrasts sharply with the situation we find in laboratories devoted to reproduction in different species of animals, mostly mammals, whose data are used, or at least should be used, after the appropriate clinical trials, to improve the effectiveness of the media employed in humans. The role of human embryologists in this field could acquire a great importance to research level if they, as specialists face daily to the handling and culture of gametes or embryos, possessed the information needed to assess the effect of different components of culture media on the success of the reproductive process. To illustrate this idea, this article presents some examples of molecules with beneficial effect on fertilization of different animal models that are not present currently in human culture media. It also reviews the current state of knowledge about the components of the culture media compared with the corresponding physiological fluids that seek to imitate. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2012; 17(1):44-52

Key words: culture media, oviductal fluid, animal models, fertilization.

#### INTRODUCCIÓN

Desde el nacimiento de Louis Brown en 1978 hasta la actualidad, el desarrollo de la fecundación *in vitro* (FIV) en la especie humana ha sido espectacular y el número de niños nacidos en el mundo por este método o por su más reciente variante, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ha ido incrementando exponencialmente. Curiosamente, aunque la primera referencia sobre el

nacimiento de un mamífero (conejo) por FIV data de 1959 (Chang, 1959), el nacimiento del primer ternero se produjo en el año 1982 (Brackett et al., 1982) y el primer potrillo no nació hasta el año 1990 (Palmer et al., 1991), es decir, 12 años después del nacimiento de Louis Brown. Aún en la actualidad, el nivel de éxito de esta técnica en las distintas especies de mamíferos está muy por debajo del alcanzado en la especie humana. Por lo tanto, podríamos decir que éste es

un campo de la biomedicina en el que el desarrollo de una tecnología o la puesta en marcha de unos determinados tratamientos en la especie humana no se han producido mayoritariamente sobre la base de la investigación de dicha técnica o tratamiento en modelos animales. Por este motivo, cabría preguntarse: ¿Tiene sentido utilizar modelos animales para continuar avanzando en el desarrollo de la FIV humana? ¿Se ha alcanzado un máximo en el éxito de este procedimiento y por

lo tanto ya no hay nada que podamos mejorar? Al margen de la necesidad de obtener gametos sanos para su uso, que no podemos "fabricar", ¿hay algo que podamos hacer para mejorar el medio de cultivo en el que tiene lugar el contacto entre los gametos, medio que sí podemos "fabricar"? Y, finalmente, ¿debería ser la composición de ese medio de cultivo similar al fluido biológico al que trata de imitar o, por el contrario, debemos intentar diseñar medios químicamente definidos que no dejen ningún cabo suelto en cuanto a la posible acción incontrolada de moléculas "desconocidas"? Éstas y otras preguntas intentarán ser respondidas en los próximos párrafos.

## 1. MODELOS ANIMALES PARA INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA REPRODUCTIVA.

En el campo de la biología reproductiva, como en muchos otros campos de la biomedicina, existe una preferencia absoluta por el ratón como modelo animal para investigación. Esto se debe, en gran parte, al espectacular desarrollo de los animales transgénicos, tanto *knock out* como *knock in* (Mansour, Thomas & Capecchi, 1988), en los que se inactivan o se introducen uno o varios genes mediante ingeniería genética y se estudia la pérdida o ganancia de función que se produce como consecuencia de dicha manipulación. De este modo se consiguen asignar funciones específicas a genes concretos. En el caso que nos ocupa, la composición de los medios de cultivo, el modelo de ratón puede no ser el más adecuado para la investigación en el tema por varias razones.

Partiendo de las particularidades fisiológicas de la reproducción en ratones y llegando hasta la estructura molecular de la zona pelúcida (ZP), las diferencias con la especie humana son mayores que las que encontramos en otros modelos animales como el porcino o el bovino. Por ejemplo, el número de crías que tienen las ratonas de forma natural, y por tanto la conformación anatómica del ovario o del útero, las alejan bastante del modelo humano, en el que sólo un ovocito suele ser ovulado en cada ciclo y en el que los cuernos uterinos apenas están desarrollados.

La ratona, como la cerda, presenta unos cuernos uterinos largos que proporcionalmente convierten casi en inexistente al cuerpo del útero, de manera que pueden albergar a los numerosos fetos que se desarrollan tras la ovulación de los correspondientes ovocitos, característica fundamental de estas especies politocas. Por otra parte, la duración de la gestación en la ratona es inferior a un mes, y en la cerda próxima a los 4 meses, lo cual también las aleja del modelo humano. En este sentido, por lo tanto, la vaca sería un modelo mucho más próximo a la mujer, ya que el número de ovulaciones por ciclo y el tiempo de gestación son prácticamente iguales en ambas especies.

La segunda razón que aleja la posibilidad de que los resultados de las investigaciones sobre el proceso de fecundación en el modelo de ratón puedan extrapolarse en algunos casos a la especie humana se basa en el hecho de que la FIV en el ratón se realiza con espermatozoides procedentes de epidídimo. Como sabemos, los espermatozoides eyaculados presentan modificaciones a nivel de la membrana plasmática tras el contacto con el plasma seminal que les protegen de una capacitación o reacción acrosómica prematuras (Fraser et al., 2006; Way, Griel & Killian, 2000) y por ello necesitan de una serie de tratamientos (técnicas de swim-up, selección a través de gradientes de densidad, etc.) antes de poder ser utilizados para la fecundación *in vitro*. Al mismo tiempo, existen proteínas en el plasma seminal que estimulan la capacidad fecundante de los espermatozoides (Calvete & Sanz, 2007), por lo que en el modelo de ratón los estudios relacionados con las moléculas implicadas en la unión y reconocimiento del ovocito deben ser considerados con cautela, ya que dichas proteínas no se encuentran presentes en los ensayos de FIV con espermatozoides de epidídimo. Esto significa que la introducción en los medios de cultivo de determinadas moléculas que pueden ser de utilidad para facilitar la motilidad o la capacidad de penetración de los espermatozoides de epidídimo puede no ser adecuada en modelos en los que se utilizan espermatozoides eyaculados.

Sin embargo, el caso contrario también es digno de mención: en especies de ungulados que podrían ser buenos modelos, como la vaca o la cerda, debido a que en los ensayos de FIV se utilizan mayoritariamente espermatozoides eyaculados, los ovocitos suelen ser de origen folicular y no han tenido, al contrario de lo que ocurre en la ratona, ningún contacto con el ambiente oviductal. Como veremos más adelante, el fluido oviductal ejerce una función importante en el proceso de interacción entre gametos, ya que es capaz de modificar los sitios de unión para los espermatozoides en la zona pelúcida, alterando su estructura y propiedades físico-químicas (Coy et al., 2008). Por ello, tampoco la FIV en estas especies simula estrictamente hablando el mecanismo molecular de unión espermatozoide-ovocito que acontece *in vivo*. Debido a que en la especie humana se utilizan ovocitos de origen folicular, estos modelos, en cualquier caso, estarían más próximos que el de ratón a los ensayos que se realizan en los laboratorios de reproducción asistida, por lo que para la investigación sobre los componentes de los medios de cultivo a emplear resultarían teóricamente más adecuados.

Finalmente, y ahondando en las diferencias a nivel molecular, es importante recordar que la zona pelúcida humana está formada por cuatro glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) (Lefievre et al., 2004) mientras que la zona de ratón está formada por tres (ZP1, ZP2, ZP3) (Bleil & Wassarman, 1980). Esto implica, de nuevo, que es probable que existan diferencias en el proceso de fecundación entre ambas especies que hagan necesarios estudios en otros modelos para comprender en mayor profundidad los mecanismos moleculares que intervienen.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO HUMANOS VERSUS MEDIOS ANIMALES

Los medios de cultivo para FIV y para las etapas iniciales del desarrollo embrionario están descritos a nivel cualitativo y cuantitativo en la mayoría de las especies domésticas, al contrario de lo que ocurre en la especie humana. La investigación en este aspecto avanza

continuamente, y se han estudiado factores como la concentración idónea de O<sub>2</sub> en el ambiente del incubador (Gomes Sobrinho et al., 2011; Goovaerts et al., 2009), los beneficios del cocultivo de los gametos con células del oviducto (Romar et al., 2003), del cumulus o de la granulosa (Campos et al., 2001; Goovaerts et al., 2009), la utilización de oviductos hospedadores de oveja para cultivo de cigotos de especies de alto valor económico (como la bovina o la equina) durante su transición hasta el estadio de blastocisto (Lazzari et al., 2010), etc.

En cuanto a su composición, todos los medios de cultivo están basados en fórmulas similares, que suelen incluir iones, compuestos energéticos (glucosa, lactato o piruvato), aminoácidos, alguna macromolécula biológica (albúmina sérica bovina, BSA) o sintética (alcohol polivinílico, PVA), vitaminas, agentes

quelantes, antioxidantes, hormonas o factores de crecimiento, antibióticos y un sistema tampón para mantener el pH estable (Gardner, 2008).

Sin embargo, mientras que las publicaciones en las que se investiga el efecto de determinadas condiciones o componentes sobre el éxito del desarrollo embrionario en especies animales indican, con todo lujo de detalles, las concentraciones de los reactivos químicos e incluso sus códigos de referencia y empresa que los comercializa, la situación en la especie humana es diferente. En primer lugar, porque los medios de fecundación o cultivo embrionario humanos están fabricados bajo unas estrictas condiciones de seguridad toxicológica, inmunológica y pureza que no están legisladas para las especies animales y, por lo tanto, los comercializan

empresas farmacéuticas o similares en régimen de competencia entre ellas. Es, en este sentido, parcialmente comprensible que protejan sus fórmulas (y en muchos casos los resultados de sus investigaciones) mediante la obtención de patentes o acuerdos de confidencialidad. Por el contrario, los medios empleados en animales, con algunas excepciones, se suelen preparar en los propios laboratorios de FIV y son completamente transparentes al estar publicados en numerosos artículos de revistas de investigación. Ejemplos de ambos casos podemos verlos en la tabla 1 en la que se muestra la fórmula completa de 3 medios de cultivo empleados en la especie porcina y en las Figuras 1 y 2, donde se muestran los datos públicos de un medio empleado en FIV humana.

**TABLA I.** Composición de diferentes medios para el cultivo de embriones porcinos (Yoshioka et al., 2002).

Componente	PZM-3	PZM-4	NCSU-23a
NaCl (mM)	108.00	108.00	108.73
KCl (mM)	10.00	10.00	4.78
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (mM)	—	—	1.70
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	0.35	0.35	1.19
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (mM)	0.40	0.40	1.19
NaHCO <sub>3</sub> (mM)	25.07	25.07	25.07
Glucosa (mM)	—	—	5.55
Piruvato Na (mM)	0.20	0.20	—
Ca-(lactato) <sub>2</sub> · 5H <sub>2</sub> O (mM)	2.00	2.00	—
L-Glutamina (mM)	1.00	1.00	—
Taurina (mM)	—	—	7.00
Hipotaurina (mM)	5.00	5.00	5.00
AA esenciales (ml/L; Sigma B6766)	20.00	20.00	—
AA no esenciales (ml/L; Sigma M7145)	10.00	10.00	—
Gentamicina (mg/ml)	0.05	0.05	0.05
BSA libre de ácidos grasos (mg/ml)	3.00	—	4.00
Alcohol Polivinílico (mg/ml)	—	3.00	—
Osmolaridad (mOsm)	288 ± 2 <sup>b</sup>	288 ± 2	291 ± 2
pH	7.3 ± 0.02	7.3 ± 0.02	7.3 ± 0.02

a En el NCSU-23, los antibióticos y la BSA (fracción-V) fueron sustituidos por gentamicina y BSA libre de ácidos grasos, respectivamente, en relación a la composición original.

b Media ± SD.

En segundo lugar, es precisamente esta preparación "in situ" de los medios de cultivo animales lo que les dota de una flexibilidad y rapidez de cambio de la que carecen los medios empleados en la especie humana. Un medio comercial que se utiliza en una clínica puede no variar durante años y, cuando lo hace, no es porque así lo decidan los embriólogos que lo usan en los laboratorios de dichas clínicas, sino porque, como resultado de las investigaciones de la casa comercial de que se trate, ésta decide hacer las modificaciones oportunas. En este sentido, y pese al buen rendimiento de los medios humanos, cabría preguntarse por cuánto se podría multiplicar el éxito de los tratamientos en las clínicas de reproducción asistida si los embriólogos de las mismas, además de los que trabajan para las compañías farmacéuticas, pudieran aportar su experiencia y participar en la toma de decisiones sobre la composición cualitativa y cuantitativa de los medios de cultivo que emplean, aunque éstos nunca puedan llegar a fabricarse "in situ" por sus requisitos especiales.

Para ilustrar esta última idea hemos realizado una búsqueda sobre medios de cultivo para FIV humana fabricados por una de las empresas del sector que más información ofrece en su página web sobre la composición de los mismos. Se trata de Medicult, que comercializó el *Universal IVF medium* hace ya 20 años. En la información del producto publicada en la página web (<http://www.origio.com>) encontramos referencias de su uso en trabajos publicados en 1992 (Hammadeh et al., 1992, no localizado en la base de datos del National Center for Biotechnology Information NCBI, coloquialmente conocida como "pubmed"), 1998 (Barak et al., 1998) y hasta 2004 (Kattera & Chen, 2004). En cuanto a su composición, todos los datos publicados son los que aparecen en la Figura 1.

Como puede observarse, la composición cuantitativa del medio no es pública. Esta misma empresa comercializa años más tarde el medio ISM1 y refiere en su página web un artículo publicado en 2010 (Xella et al., 2010) en el que, tras un estudio comparativo con el *Universal*

**Figura 1.** Componentes del *Universal IVF Medium* de Medicult



## Universal IVF Medium

For fertilization and culture until 2-8 cell stage.  
Can also be used for embryo transfer.

- High glucose medium for fertilization
- The best conditions for gamete fusion
- Consistent, high fertilization rates for more than a decade

### Composition

Calcium Chloride · Gentamicin sulphate · Glucose · Human Albumin Solution · Magnesium Sulfate · Milli RX Water · Phenol Red (1031 only) · Potassium Chloride · Sodium Bicarbonate · Sodium Chloride · Sodium phosphate · Sodium Pyruvate · SSR® (Synthetic Serum Replacement)

*IVF medium*, se demuestra que con este nuevo medio mejora el desarrollo embrionario y se obtienen tasas de gestación mayores.

Los datos sobre la composición del medio en esta ocasión son los que se refieren en la Figura 2:

**Figura 2.** Componentes del *ISM1* de Medicult

### Composition

Adenine · Alanine · Arginine · Ascorbic acid · Asparagine · Calcium Lactate · Cholesterol · Cysteine · Cystine · Cytosine · EDTA · Gentamicin sulphate · Glucose · Glutamine · Guanine · Histidine hypotaurine · Human Albumin Solution · Isoleucine · Leucine · Lysine · Magnesium Sulfate · Malic acid · Methionine · Milli RX Water · Phenol Red (1050 only) · Phenylalanine · Potassium Chloride · Potassium Phosphate · Proline · Serine · Sodium acetate · Sodium Bicarbonate · Sodium Chloride · Sodium Citrate · Sodium Pyruvate · Taurine · Threonine · Thymine · Tryptophan · Tyrosine · Uracile · Valine

Es decir, la empresa ha cambiado el medio de FIV aproximadamente 15 años después de haber comercializado la primera versión. ¿Significa esto que en 15 años no se ha producido ningún avance en la investigación sobre la

composición de los medios de cultivo y no se ha identificado ninguna nueva molécula de interés para su inclusión en la fórmula?

Si realizamos una búsqueda similar en las páginas de cualquier otra empresa que comercialice medios de cultivo, la información que aportan sobre los mismos suele ser incluso menor. Así, en el caso de Vitrolife (<http://www.vitrolife.com>), todo lo que sabemos sobre el G-IVF plus es que se trata de un medio tamponado con bicarbonato y que contiene hialuronano y BSA. Para el caso del Quinn's Advantage Fertilization (HTF) Medium, de SAGE Biopharma (<http://www.biocareeurope.com>), la información es algo más abundante, ya que se indica que contiene cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato magnésico, fosfato potásico, lactato cálcico, bicarbonato sódico, glucosa, piruvato sódico, alanil-glutamina, taurina, L-asparagina, L-ácido aspártico, glicina, L-prolina, L-serina, citrato sódico, EDTA, gentamicina y rojo fenol. En cuanto al Fertilization Medium de Cook (<http://www.cookartlab.com/>), la información publicada indica que es un medio tamponado con bicarbonato que contiene glucosa, antioxidantes y aminoácidos no esenciales. Finalmente, en el caso de Global (<http://www.ivfglobal.com/>), los datos públicos nos informan de que es un medio libre de glucosa y fosfato, y de que contiene EDTA, taurina, glutatión y alanil glutamina.

De todo lo expuesto anteriormente podríamos concluir que los avances que se han ido produciendo en la composición de los medios de cultivo empleados en las clínicas humanas derivan fundamentalmente de investigaciones privadas que no incluyen la opinión más o menos directa de los usuarios finales de estos medios, los embriólogos que trabajan en los laboratorios de FIV. Además, es desconocido para la opinión pública en qué se basan estos avances, y qué modelos animales se utilizan, en caso de que se utilicen, para obtenerlos. Obviamente, el ratón es la especie más probablemente empleada pero, a la vista de los comentarios anteriores, cabría preguntarse si el uso de otras

especies que presentan mayores semejanzas fisiológicas con la especie humana y que, además, no se sacrifican expresamente para la obtención de gametos, como es el caso de la cerda o la vaca, no merecería un mayor interés por parte de las empresas implicadas en la investigación en este campo.

### 3. FLUIDO OVIDUCTAL VERSUS MEDIOS DE CULTIVO

Otro aspecto que resulta interesante para su discusión es el relacionado con la toma de decisiones sobre los componentes que deben incluirse en un medio de FIV y las características físico-químicas que debe tener dicho medio. La opción que, *a priori*, parecería más lógica, sería la de imitar al máximo lo que ocurre en la naturaleza. Es decir, un medio de cultivo ideal debería ser lo más parecido posible al medio fisiológico al

que pretende sustituir. Sin embargo, la cuestión es mucho más compleja de lo que parece a simple vista.

En primer lugar, porque en relación a las características físico-químicas del medio de FIV, parece evidente que la mayoría necesitan ser optimizadas conforme van siendo accesibles más datos relativos a sus valores en el fluido oviductal (Gardner, 2008). En condiciones fisiológicas, es evidente que existen variaciones espacio-temporales de dichas características que afectan al éxito final de la fecundación (Hunter, 2011). En el laboratorio, los valores adecuados de pH, temperatura y osmolaridad pueden fluctuar en función de la composición del medio y el estadio de desarrollo de las células que contiene (Gardner, 2008), por lo que sería importante tener un control más exhaustivo de estos parámetros y ajustarlos a las necesidades de nuestros

cigotos o embriones. En cuanto a la viscosidad, el fluido oviductal es mucho más viscoso que los medios de FIV y éste es un parámetro que ha sido muy poco estudiado (Hunter et al., 2011). Datos recientes indican que el fenómeno de hiperactivación que observamos en los espermatozoides cuando los introducimos en medios de cultivo convencionales puede deberse a la baja viscosidad de los mismos y que dicho fenómeno no ocurriría en el oviducto (Kirkman-Brown & Smith, 2011). Esto podría tener una gran relevancia en cuanto al diferente proceso de selección que experimentarían los espermatozoides en un medio viscoso, ya que los que fueran capaces de migrar a través de él podrían no ser los que en el laboratorio consideramos como más aptos por las características de su movimiento.

En segundo lugar, porque conocer la composición exacta del fluido oviductal,

**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 espermatozoides, cultivo de embriones, criopreservación y Maduración In Vitro de ovocitos.

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



el medio en el que tiene lugar la fecundación *in vivo*, es un objetivo hoy día inconcluso. No sólo resulta compleja la obtención del fluido *in vivo* (durante intervenciones quirúrgicas en mujeres o canulaciones directas del oviducto en animales de experimentación) o *in vitro* (mediante la escisión del oviducto tras el sacrificio de animales de abasto o mediante perfusión vascular y luminal, Leese et al., 2008) sino que los datos obtenidos tras el análisis de las muestras pueden verse alterados por el método de recogida utilizado (Leese et al., 2008). Además, hay que tener en cuenta que el fluido oviductal no tiene una composición estática, ya que la secreción de las células epiteliales del oviducto está regulada hormonalmente y, precisamente tras la ovulación, los niveles de estrógenos y progesterona se ven significativamente afectados. Esto implica que desde el momento en que el ovocito es ovulado hasta que ocurre la fecundación y durante las siguientes horas, la composición del fluido sufre variaciones que aún hoy día no han sido determinadas con precisión (Hunter, 2011). Ésta es la razón última de la oferta comercial de medios de cultivo secuenciales, que teóricamente se adaptan a la composición del fluido oviductal en cada etapa.

En tercer y último lugar, porque aun conociendo con exactitud la composición del fluido oviductal en condiciones fisiológicas en cada una de las etapas cercanas al momento de la fecundación, el número de componentes es tan elevado que resultaría enormemente costoso fabricar un medio que los incluyera a todos. Dejando a un lado otros componentes, y centrándonos exclusivamente en las proteínas, podemos entender mejor esta última afirmación. Gracias al desarrollo de la Biología Molecular y, más concretamente, de las técnicas de proteómica o genómica funcional estamos asistiendo en los últimos años a un incremento gigantesco en el número de datos existentes sobre las proteínas que están presentes en un determinado tejido en una situación concreta. Así, hoy disponemos por ejemplo de estudios realizados con células del epitelio oviductal humano (Tone et al., 2008) en las que se han

determinado los genes que se expresan diferencialmente en la fase luteínica de mujeres portadoras de una mutación génica frente a mujeres normales. En este estudio se identifican 21 genes regulados a la baja en mujeres sanas en fase luteal y 322 genes regulados a la baja en esta misma fase en mujeres portadoras, siendo 3 genes de éstos coincidentes en ambos grupos. De modo similar, y utilizando la misma tecnología de *microarrays* de este estudio, es posible conocer las diferencias en la expresión génica de las células del oviducto entre las fases folicular y luteínica. Teniendo en cuenta que el número total de genes expresados en este tipo celular es de varios miles, se puede entender que la información que se maneja es muy difícil de trasladar a la práctica. En cualquier caso, esta información nos ofrecería una primera aproximación a las posibles proteínas que podrían estar jugando un papel clave durante los momentos previos a la fecundación, durante la fecundación propiamente dicha y tras la formación del cigoto, ya que sus correspondientes genes se estarían expresando diferencialmente en cada etapa.

Para concretar más estos datos, y conocer las proteínas candidatas a ser incluidas en los medios para la fecundación o para las etapas iniciales del desarrollo embrionario, es necesario complementar los estudios de genómica funcional en las células epiteliales con los de proteómica en el fluido oviductal. De este modo, sólo aquellos genes que se expresaran diferencialmente en cada fase y que se tradujeran en proteínas secretadas a la luz oviductal serían de interés para estudiar su efecto sobre los resultados de fecundación. Los datos sobre las proteínas presentes en el fluido oviductal humano no son muy abundantes, pero una revisión reciente que incluye las referencias publicadas sobre proteínas identificadas en el oviducto de diferentes mamíferos indica que son, al menos, 160 (Avilés, Gutiérrez-Adán & Coy, 2010). De ellas, hay algunas cuya función es ampliamente conocida y otras de las que aún se sabe muy poco, pero lo que resulta evidente es que si el epitelio oviductal secreta activamente unos componentes determinados en

momentos muy concretos del proceso de fecundación y primeras divisiones embrionarias, es porque dichos componentes tienen una función que realizar. En este sentido, se ha comprobado que la presencia de los gametos en el oviducto modifica la expresión de determinadas proteínas, siendo algunas de ellas exclusivamente reguladas por los ovocitos, otras por los espermatozoides y otras por ambos (Georgiou et al., 2005).

Entre los procesos que tienen lugar en el oviducto y que pueden estar modulados por las moléculas presentes en el fluido oviductal podemos mencionar la maduración final de los gametos, incluyendo la maduración zonal del ovocito (Coy & Avilés, 2010) y las últimas etapas de la capacitación espermática (Suarez, 2007); el reconocimiento y unión entre espermatozoides y ovocitos, o fecundación propiamente dicha; las primeras divisiones embrionarias, ya que se han descrito diversos factores embriotróficos en el oviducto (Lee & Yeung, 2006), o la protección del embrión frente a efectos adversos sobre la transcripción/replicación del DNA mitocondrial y apoptosis (Lloyd et al., 2009).

A modo de resumen, podríamos decir que para mejorar la eficacia de los medios de FIV humana actuales sería necesario seleccionar aquellas moléculas del fluido oviductal que hubieran demostrado previamente, en modelos animales, un efecto beneficioso en el éxito final del proceso. Dos proteínas candidatas que cumplen estos requisitos y no están incluidas en los medios de FIV actualmente son la proteína específica del oviducto OVGP1 u oviductina y el plasminógeno, y a ellas dedicaremos el último apartado de este artículo.

#### 4. NUEVOS COMPONENTES ¿SE INCORPORARÁN ALGÚN DÍA?

##### 4.1. GLICOPROTEÍNA ESPECÍFICA DEL OVIDUCTO U OVIDUCTINA (OVGP1)

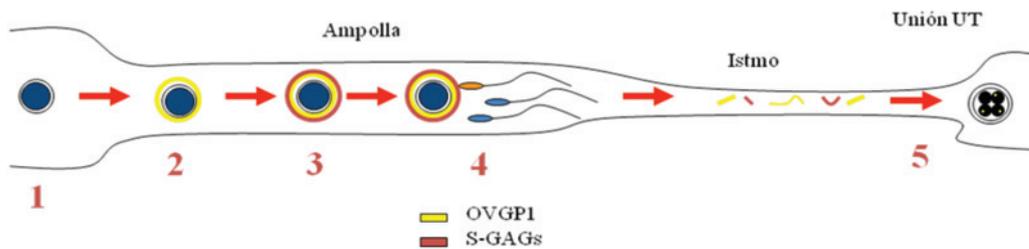
La OVGP1 ha sido identificada en varias especies de mamíferos incluyendo a la mujer, ratona, hámster, vaca, cerda, y babuina (Arias, Verhage & Jaffe,

1994; Bui et al., 1996; Donnelly et al., 1991; Sendai et al., 1994; Sendai et al., 1995; Suzuki et al., 1995). Su secreción depende de las concentraciones séricas de estrógenos y se ha demostrado su unión a la ZP de los ovocitos tras la llegada de éstos al oviducto en algunas especies. En la mujer, aunque no hay evidencias directas de ello, sí hay datos indirectos que así lo sugieren (O'Day-Bowman et al., 1996).

Entre sus funciones, se le ha atribuido una mejora de los resultados de fecundación y desarrollo embrionario (McCauley et al., 2003) mediada por la modulación de la unión de los espermatozoides a la ZP. Recientemente, se ha avanzado en la descripción de su mecanismo de acción

y se ha podido demostrar que interviene en el aumento de la resistencia de la ZP a la digestión enzimática tras su contacto con el fluido oviductal (Coy et al., 2008). Este hecho conlleva que la zona, a su vez, se hace más resistente a la unión de espermatozoides, por lo que la OVGP1 contribuye al control de la polispermia. Hasta hace unos años, y sobre la base de estudios en roedores, se consideraba que este fenómeno, denominado "hardening" o endurecimiento de la ZP, era debido a la liberación del contenido de los gránulos corticales del ovocito tras la entrada del primer espermatozoide (Barros & Yanagimachi, 1971; Gulyas & Yuan, 1985). Sin embargo, al menos en la vaca y la cerda se ha podido comprobar que el endurecimiento de la ZP es un

fenómeno previo a la fecundación, tiene lugar en el oviducto y se debe a la unión de OVGP1 y glicosaminoglicanos tipo heparina a la ZP (Coy et al., 2008). El mecanismo es reversible, es decir, los ovocitos presentan la ZP "endurecida" cuando se encuentran en la ampolla oviductal listos para contactar con los espermatozoides. Si los situamos en un medio carente de heparina, la resistencia de la ZP desaparece (Coy et al., 2008). Es más, en los cigotos recogidos del istmo o en los embriones recién llegados al útero, la ZP recupera su baja resistencia inicial a la digestión proteolítica (Kolbe & Holtz, 2005), lo que facilitaría el proceso de eclosión del blastocisto. Una representación esquemática de este mecanismo podemos observarla en la Figura 3.



**Figura 3** (modificada de Coy & Avilés, 2010). Descripción del mecanismo pre-fecundación propuesto para la prevención de la polispermia en ungulados. Cuando el ovocito es liberado en la ampolla (1) poco después de la ovulación, la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1) lo rodea formando una "cubierta" que es responsable de la resistencia de la ZP a la proteólisis (2). Los glicosaminoglicanos tipo heparina (S-GAGs) del fluido oviductal estabilizan y refuerzan la unión OVGP1 con la ZP (3), afectando su interacción con los espermatozoides seleccionados (4). Durante el tránsito del ovocito fecundado hacia el útero, el sistema se desestabiliza y la OVGP1 es desprendida parcialmente o introducida en el interior del cigoto (5).

Todos los datos anteriores indican claramente que la OVGP1 está implicada en el éxito de la fecundación y, sin embargo, no forma parte de los componentes de los medios de FIV. En la actualidad, del mismo modo que se ha introducido la BSA recombinante o el hilaaronano en los medios comerciales, la producción de OVGP1 recombinante y su inclusión en los mismos redundaría muy probablemente en beneficio de las pacientes.

#### 4.2. SISTEMA PLASMINÓGENO PLASMINA

El plasminógeno es un zimógeno secretado mayoritariamente por el hígado que participa en la resolución de los coágulos sanguíneos tras su activación en la enzima proteolítica plasmina (Collen & Lijnen, 1995). Dicha activación está mediada por activadores denominados tPA, o

activador del plasminógeno tipo tisular y uPA, o activador del plasminógeno tipo uroquinasa. En general, el sistema plasminógeno-plasmina está presente en numerosos tejidos orgánicos y su función principal consiste en degradar la matriz extracelular. Por ello, se ha demostrado su intervención en procesos como la invasión de tejidos por las células tumorales (Andreasen, Egelund & Petersen, 2000), la implantación del embrión en el endometrio (Menino et al., 1997) o la rotura de la pared folicular durante la ovulación (Liu, 2004).

Recientemente, se ha determinado la presencia de plasminógeno en el fluido oviductal de cerda y de vaca, cuantificando su concentración, que está muy próxima a los niveles encontrados en el plasma sanguíneo humano (Mondéjar et al., 2011).

Por lo tanto, es muy probable que el plasminógeno también se encuentre en el fluido oviductal de la mujer. En el estudio de Mondéjar et al. (2011) se observó que el plasminógeno se une a la ZP y al oolema de los ovocitos y que tras el contacto con el espermatozoide su presencia es menor. Esto coincidió con la liberación total o parcial de los activadores de plasminógeno (tPA y uPA) que también estaban presentes en el ovocito. En cuanto a los resultados de FIV, la adición de plasminógeno disminuyó el número de espermatozoides que penetraron en los ovocitos lo cual, en algunas especies como la cerda, donde la polispermia es muy elevada, puede suponer una ventaja. Lo más importante de este estudio es que sugiere que el sistema plasminógeno-plasmina se activa en los ovocitos durante su interacción con los

espermatozoides y, por lo tanto, si lo regulamos al alza o a la baja añadiendo activadores o inhibidores en los medios de cultivo podemos aumentar o disminuir la penetración espermática según nos interese en la especie en la que estemos trabajando.

De gran interés también es el hecho de que los activadores del plasminógeno se han detectado en los espermatozoides humanos y de varias especies animales (Smokovitis et al., 1987) y que su influencia sobre la reacción acrosómica y la motilidad espermática parece demostrada (Hong et al., 1985). Por ello, su inclusión en los medios de FIV humana podría resultar beneficiosa para favorecer la funcionalidad de los espermatozoides.

Finalmente, el hecho de que el sistema plasminógeno-plasmina intervenga en la invasión del endometrio por parte del embrión (Aflalo et al., 2004) lo convierte en un buen candidato para ser utilizado en los medios de transferencia de embriones y disminuir de este modo los fallos de implantación.

## CONCLUSIONES

La variada composición del fluido oviductal y su enorme dinamicidad espacio-temporal hacen muy complicado el diseño de medios para FIV que reflejen fielmente las características de este fluido. Sin embargo, la investigación basada en estudios de proteómica y genómica puede aportar interesantes datos sobre moléculas, nuevas o ya conocidas, que podrían incrementar la eficacia de las ARTs si se incluyeran en los medios de cultivo comerciales. Es labor de todas las personas que trabajan en las clínicas de reproducción asistida contribuir al desarrollo de estos medios de cultivo futuros para mejorar el servicio que se ofrece a las parejas con problemas de fertilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aflalo, E. D., Sod-moriah, U. A., Potashnik, G. & Har-Vardi, I. (2004). Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fertil Steril* 81 Suppl 1, 780-785.

Andreasen, P., Egelund, R. & Petersen, H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57, 25-40.

Arias, E. B., Verhage, H. G. & Jaffe, R. C. (1994). Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* 51, 685-694.

Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A. & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 16, 896-906

Barak, Y., Goldman, S., Gonen, Y., Nevo, Z., Bartoov, B. & Kogosowski, A. (1998). Does glucose affect fertilization, development and pregnancy rates of human in-vitro fertilized oocytes? *Hum Reprod* 13 Suppl 4, 203-211.

Barros, C. & Yanagimachi, R. (1971). Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233, 268-269.

Bleil, J. & Wassarman, P. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 76, 185-202.

Brackett, B. G., Bousquet, D., Boicet, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. & Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27, 147-158.

Buhi, W. C., Alvarez, I. M., Choi, I., Cleaver, B. D. & Simmen, F. A. (1996). Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* 55, 1305-1314.

Calvete, J. J. & Sanz, L. (2007). Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 201-215.

Campos, I., Coy, P., Romar, R., Ruiz, S. & Gadea, J. (2001). Effects of maturational stage, cumulus cells and coincubation of mature and immature cumulus-oocyte complexes on in vitro penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology* 55, 1489-500.

Chang, M. C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 184(Suppl 7), 466-467.

Collen, D. & Lijnen, H. (1995). Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 74, 167-171.

Coy, P. & Avilés, M. (2010). What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc* 85, 593-605.

Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M., Romar, R., Grullón, L., Matás, C. & Avilés, M. (2008). Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15809-15814.

Donnelly, K., Fazleabas, A., Verhage, H., Mavrogianis, P. & Jaffe, R. (1991). Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Mol Endocrinol* 5, 356-364.

Fraser, L. R., Adeoya-Osiguwa, S. A., Baxendale, R. W. & Gibbons, R. (2006). Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci* 11, 1636-1645.

Gardner, D. (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev* 20, 9-18.

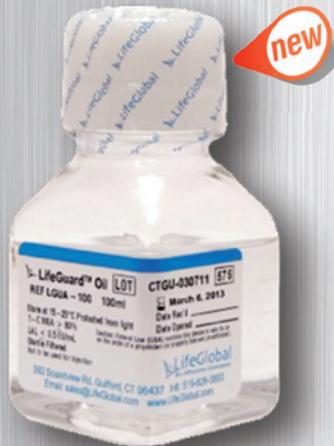
Georgiou, A. S., Sostaric, E., Wong, C. H., Snijders, A. P., Wright, P. C., Moore, H. D. & Fazeli, A. (2005). Gametes alter the oviductal secretory proteome. *MolCell Proteom: MCP* 4, 1785-1796.

Gomes Sobrinho, D. B., Oliveira, J. B., Petersen, C. G., Mauri, A. L., Silva, L. F., Massaro, F. C., Baruffi, R. L., Cavagna, M. & Franco, J. G. (2011). IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 143.

Goovaerts, I. G., Leroy, J. L., Van Soom, A., De Clerq, J. B., Andries, S. & Bols, P. E. (2009). Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology* 71, 729-738.

Gulyas, B. J. & Yuan, L. C. (1985). Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J Exp Zool* 233, 269-276.

- Hong, C., Chiang, B., Huang, J. & Wu, P. (1985). Two plasminogen activators, streptokinase and urokinase, stimulate human sperm motility. *Andrologia* 17, 317-320.
- Hunter, R. H. (2011). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 87, 244-255.
- Hunter, R. H., Coy, P., Gadea, J. & Rath, D. (2011). Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet* 28, 191-197.
- Kattera, S. & Chen, C. (2004). Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 19, 294-9.
- Kirkman-Brown, J. C. & Smith, D. J. (2011). Sperm motility: is viscosity fundamental to progress? *Mol Hum Reprod* 17, 539-544.
- Kolbe, T. & Holtz, W. (2005). Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of *in vivo* and *in vitro* derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 63, 1695-1705.
- Lazzari, G., Colleoni, S., Lagutina, I., Crotti, G., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Duchi, R. & Galli, C. (2010). Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus *in vitro* culture for different domestic species. *Theriogenology* 73, 748-757.
- Lee, K. F. & Yeung, W. S. (2006). Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on *in vitro* culture. *Hum.Fertil.* 9, 137-143.
- Leese, H., Hugentobler, S., Gray, S., Morris, D., Sturmey, R., Whitear, S. & Sreenan, J. (2008). Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev* 20, 1-8.
- Lefievre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C. & Barratt, C. L. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 19, 1580-1586.
- Liu, Y. X. (2004). Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front Bios* 9, 3356-3373.
- Lloyd, R. E., Romar, R., Matas, C., Gutierrez-Adan, A., Holt, W. V. & Coy, P. (2009). Effects of oviductal fluid on the development, quality and gene expression of porcine blastocyst produced *in vitro*. *Reproduction* 137, 679-687.
- Mansour, S. L., Thomas, K. R. & Capecci, M. R. (1988). Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
- Maccauley, T. C., Buhi, W. C., Wu, G. M., Mao, J., Caamano, J. N., Didion, B. A. & Day, B. N. (2003). Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 69, 828-834.
- Menino, A. J., Hogan, A., Schultz, G., Novak, S., Dixon, W. & Foxcroft, G. (1997). Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig. *Dev Genet* 21, 68-74.
- Mondéjar, I., Grullón, L. A., García-Vázquez, F. A., Romar, R. & Coy, P. (2011). Fertilization outcome could be regulated by binding of oviductal plasminogen to oocytes and by releasing of plasminogen activators during interplay between gametes. *Fertil Steril* 2011 Dec 16. [Epub ahead of print]. PMID:22177313
- O'day-Bowman, M. B., Mavrogianis, P. A., Reuter, L. M., Johnson, D. E., Fazleabas, A. T. & Verhage, H. G. (1996). Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following *in vitro* incubation. *Biol Reprod* 54, 60-69.
- Palmer, E., Bézard, J., Magistrini, M. & Duchamp, G. (1991). *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* 44, 375-384.
- Romar, R., Coy, P., Ruiz, S., Gadea, J. & Rath, D. (2003). Effects of oviductal and cumulus cells on *in vitro* fertilization and embryo development of porcine oocytes fertilized with epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 59, 975-986.
- Sendai, Y., Abe, H., Kikuchi, M., Satoh, T. & Hoshi, H. (1994). Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol.Reprod.* 50, 927-934.
- Sendai, Y., Komiya, H., Suzuki, K., Onuma, T., Kikuchi, M., Hoshi, H. & Araki, Y. (1995). Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol. Reprod.* 53, 285-294.
- Smokovitis, A., Kokolis, N., Alexopoulos, C., Alexaki, E. & Eleftheriou, E. (1987). Plasminogen activator activity, plasminogen activator inhibition and plasmin inhibition in spermatozoa and seminal plasma of man and various animal species, Effect of plasmin on sperm motility. *Fibrinolysis* 1, 253-257.
- Suarez, S. S. (2007). Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Repro Fert Dev* 19, 103-110.
- Suzuki, K., Sendai, Y., Onuma, T., Hoshi, H., Hiroi, M. & Araki, Y. (1995). Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 53, 345-354.
- Tone, A., Begley, H., Sharma, M., Murphy, J., Rosen, B., Brown, T. & Shaw, P. (2008). Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 4067-4078.
- Way, A. L., Griel, L. C. & Killian, G. J. (2000). Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 21, 213-219.
- Xella, S., Marsella, T., Tagliasacchi, D., Giulini, S., La Marca, A., Tirelli, A. & Volpe, A. (2010). Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril* 93, 1859-1863.



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



**Global Total™** suplementado con Albúmina enriquecida con  $\alpha$  y  $\beta$  Globulinas



★ **Lite Oil™**  
Aceite mineral



**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

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

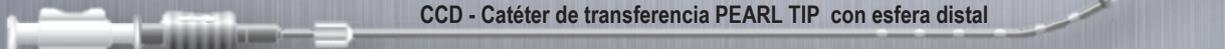
CCD - Aguja OPS de punción de ovocitos



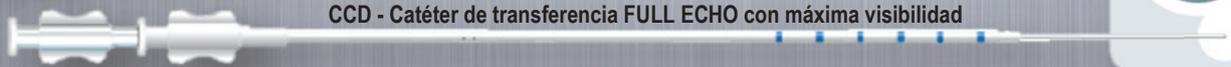
Pipetas SUNLIGHT USA para ICSI en todas las graduaciones y modelos



CCD - Catéter de transferencia PEARL TIP con esfera distal



CCD - Catéter de transferencia FULL ECHO con máxima visibilidad



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



MATERIAL CONSUMIBLE

Y TODO EL EQUIPAMIENTO NECESARIO PARA EL LABORATORIO FIV

## IV RECOGIDA DE DATOS DE DGP EN ESPAÑA: 1 DE ENERO DEL 2008 A 31 DE DICIEMBRE DE 2009

Esther Velilla <sup>1,2,5</sup>, Silvia Fernández <sup>2,5</sup>, Mònica Parriego <sup>3,5</sup>, Mireia Sandalinas <sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Institut Marquès. Barcelona

<sup>2</sup> Centro de Medicina Embrionaria. Barcelona

<sup>3</sup> Institut Universitari Dexeus. Barcelona

<sup>4</sup> Reprogenetics. Barcelona

<sup>5</sup> Grupo de interés en Genética y Reproducción, ASEBIR

### INTRODUCCIÓN

En octubre de 2001 en el seno del primer Congreso de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) se creó el Grupo de Interés de diagnóstico genético preimplantacional (GiDgp) con el objeto de: recopilar la información de todos los centros que aplican esta metodología de análisis y poder valorar la situación del Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP) en nuestro país; aportar a los embriólogos y clínicos expertos en reproducción asistida los recursos pedagógicos necesarios para poder manejar los casos de DGP de una forma más estricta; generar masa crítica entre los expertos en Genética con el fin de poder asesorar a las Autoridades Sanitarias y ofrecer elementos de juicio en relación con las autorizaciones de casos concretos y legislaciones futuras; encabezar iniciativas encaminadas a regular la "acreditación" de los laboratorios que ofrecen DGP; intercambiar información relativa a nuevas técnicas y/o aplicaciones y poner en contacto sociedades científicas como ASEBIR y la Asociación Española de Genética Humana (AEGH).

En 2010 el grupo de interés cambia de nombre y pasa a denominarse Grupo de interés en Genética y Reproducción (GiGR). Hasta la actualidad se han realizado 4 recogidas de datos de ciclos de DGP en España. En las últimas recogidas la participación de los centros ha sido creciente y los datos han sido presentados a la comunidad científica a través de diversas comunicaciones a congresos especializados. La primera recogida de datos se realizó en 2005, comprendía el período de actividad de **Marzo**

**de 1993 a Septiembre de 2005** y fue presentada en el III Congreso de ASEBIR en Zaragoza. La segunda recogida de datos se realizó en 2007, participaron 27 centros y recogió la actividad comprendida desde **Octubre de 2005 a Diciembre de 2006**. Los datos se presentaron en el IV Congreso de ASEBIR en Bilbao. En 2009 se realizó la tercera recogida de datos, en la que participaron 32 centros y recogió la actividad comprendida desde el **1 Enero de 2007 al 31 Diciembre de 2007**. Los datos se presentaron en el V Congreso de ASEBIR en Valencia.

Finalmente, la última recogida de datos se realizó en 2011. Participaron 33 centros y recogió la actividad comprendida desde el **1 de Enero de 2008 al 31 de Diciembre de 2009**. Los datos fueron presentados por parte del GiGR en el VI Congreso ASEBIR en Girona. Este artículo pretende resumir la actividad de DGP realizada en España y observada en esta última recogida de datos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

A través de la secretaría de ASEBIR se invitó a todos los centros de reproducción asistida registrados en esta sociedad científica a participar en la 4ª recogida de datos de los ciclos de DGP. Para ello se envió un archivo Excel elaborado por el GiGR con los datos de DGP de interés de la actividad realizada en los centros, en el período comprendido entre el 1 de enero de 2008 y el 31 de diciembre de 2009.

Se establecieron las siguientes indicaciones:

- Abortos de repetición (ABR): 2 o más abortos previos (no se incluyen bioquímicos).

- Fallos repetidos de FIV (FFIV): Más de dos ciclos de FIV previos sin embarazo.
- Edad materna avanzada (EMA): Ciclo de FIV con ovocitos propios procedentes de mujeres mayores de 37 años.
- Pacientes con embarazos previos trisómicos (PTRI): Pacientes con antecedentes de 1 o más concepciones previas trisómicas.
- Factor masculino genético (FMG): FISH alterado o estudio de meiosis alterado.
- Factor masculino (FM): Seminograma alterado.
- Translocación recíproca (TREC).
- Inversiones (INV).
- Translocación Robertsoniana (TROB).
- Enfermedad monogénica NO ligada al sexo.
- Enfermedad monogénica ligada al sexo.

Una vez recibidos los datos por parte de ASEBIR se codificó el nombre del centro y se distribuyó al GiGR para su análisis. Tras un período de detección de errores y corrección de los datos con los centros con la ayuda de la secretaría de ASEBIR, se realizaron los resúmenes y tablas que se muestran a continuación donde se muestran los resultados embriológicos de los ciclos reportados.

## RESULTADOS

Se incluyen datos de 33 centros participantes. La Figura 1 muestra el aumento de centros participantes en las recogidas de datos de DGP.

La tabla I muestra los datos globales de DGP registrados durante los años 1993 y

2009 habiéndose realizado un total de 11694 ciclos de FIV-DGP, incluyéndose los ciclos de DGP para *screening* de aneuploidías, anomalías cromosómicas estructurales y enfermedades monogénicas. Se observa un incremento progresivo en la aplicación del DGP en los tratamientos de reproducción asistida a lo largo de los diferentes

años. Hay que tener en cuenta que en la primera recogida de datos se incluyeron 12 años de actividad y se destaca que en el período 2008-2009 se ha realizado mayor actividad (4080 ciclos) que en los 12 primeros años (3373), siendo ya una técnica consolidada en los tratamientos de reproducción asistida en España.

Figura 1. Número de centros participantes en las 4 recogidas de datos realizadas.

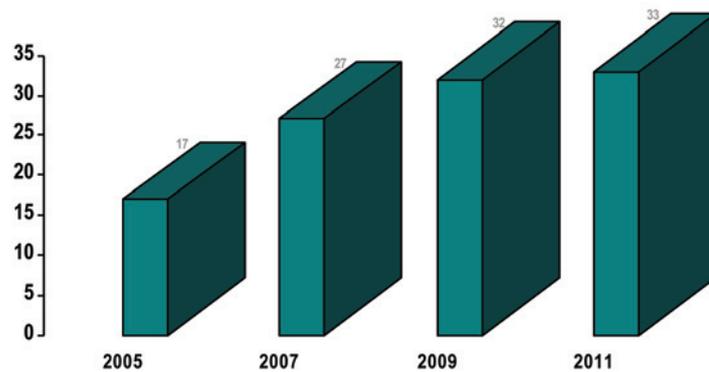


Tabla I. Resultados globales de datos de DGP recogidos durante los años 2005-2011, correspondientes a los ciclos de DGP realizados en España en el período 1993-2009.

	04/1993-09/2005 (17 centros)		10/2005-2/2006 (27 centros)		01/2007-12/2007 (32 centros)		01/2008-12/2009 (33 centros)		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	3373		2324		1917		4080		11694	
Transferencias	2262	67	1587	68	1151	60	2436	59.7	7436	62.5
Embarazos positivos	794	35.1	662	42	407	35	919	37.72	2782	37.6
Únicos	572	72.0	520	78.5	287	70.5	664	72.25	2043	56.2
Gemelares	211	26.6	138	20.8	109	26.8	236	25.68	694	24.6
Múltiples	11	1.4	4	0.6	11	2.7	19	48.36	45	1.5
Abortos	159	20.0	105	16	70	17.0	160	17.41	494	17.6

De los 4080 ciclos reportados al GiGR durante el período 2008-2009, el 84% corresponde a diagnóstico de aneuploidía, un 8% a reorganizaciones cromosómicas y el 8% restante a enfermedades monogénicas.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en función del tipo de DGP realizado:

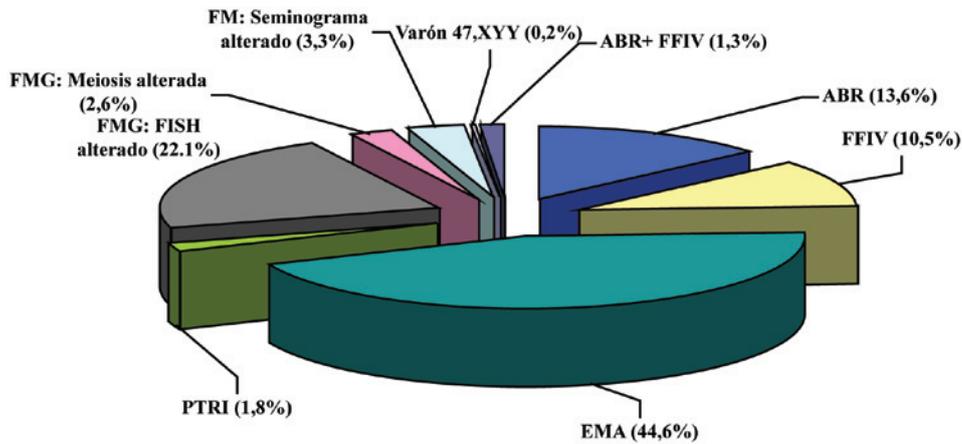
### DGP PARA SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS

Un 44.5% de los ciclos fueron indicados por edad materna avanzada, siendo ésta la indicación más frecuente, seguida de los ciclos con un resultado de FISH en espermatozoides alterado (22%), abortos de repetición (13.6%) y fallo

de implantación (más de dos FIV sin embarazo) entre otros (Figura 2).

La tabla II muestra los resultados embriológicos de los ciclos de DGP para *screening* de aneuploidías realizados durante el período del 1 de enero de 2008 al 31 de diciembre de 2009. Se realizaron un total de 3422 ciclos de DGP para *screening* de aneuploidías.

Figura 2. Distribución de las indicaciones para la realización del DGP para screening de aneuploidías.



Si se analiza el tipo de anomalía cromosómica detectada en los embriones (Figura 3) se observa que la más frecuente es la aneuploidía simple (alteración de uno

o dos cromosomas) en un 79%, seguida por la aneuploidía múltiple o compleja (3 o más cromosomas alterados).

Los resultados clínicos tras la aplicación del DGP para *screening* de aneuploidías se muestran en la tabla III.

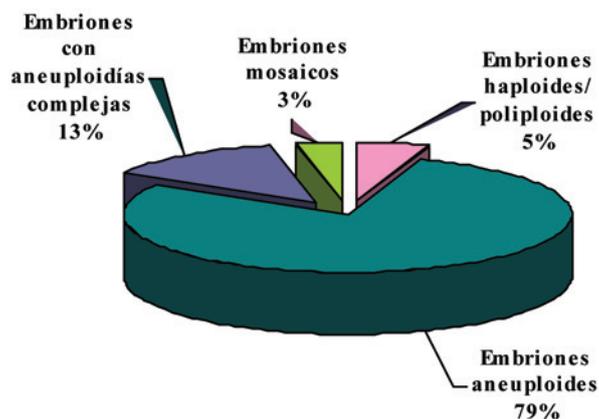
Tabla II. Ciclos de DGP para screening de aneuploidías realizados durante el período del 1 de enero de 2008 al 31 de diciembre de 2009.

	Screening de Aneuploidías	
	N	%
Ciclos	3422	-
Ovocitos inseminados	25871	-
Ovocitos fecundados	18278	70.6
Embriones biopsiados	13208	72.5
Media embriones biopsiados/ciclo	3.8	-
Embriones con diagnóstico	12773	97.0
Embriones normales	4194	32.8

Tabla III. Datos globales de DGP para screening de aneuploidías.

	01/2008-12/2009 (33 centros)	
	N	%
Ciclos	3422	-
Transferencias	1903	55.6
Embarazos positivos	731	38.4
Únicos	538	73.6
Gemelares	180	24.6
Múltiples	13	1.8
Abortos	124	17
Recién nacidos vivos	708	37.2

Figura 3. Tipo de anomalía cromosómica observada



Cabe destacar la baja tasa de ciclos que llegan a transferencia (55.6%) en comparación con otros registros publicados (70.3%; Harper et al., 2010). Esto podría deberse al bajo número de embriones biopsiados por ciclo o a diferencias en la distribución de las indicaciones. En nuestro registro se muestra una media de 3.8 embriones

biopsiados y en los datos reportados por el PGD *consortium* una media de 5.0. A menor número de embriones biopsiados, menos posibilidades de encontrar un embrión normal y llegar así a poder transferir. Ahora bien, en aquellos casos en los que hubo transferencia, se obtuvo un porcentaje de embarazo del 38.4%, superior al

30% descrito en el registro del PGD *consortium* (Harper et al., 2010).

En la tabla IV se muestran los ciclos de DGP realizados según el número de cromosomas analizados en las dos últimas recogidas de datos. Se observa una clara tendencia a aumentar el número de cromosomas analizados.

**Tabla IV.** Resultados obtenidos según el número de cromosomas analizados en los ciclos de DGP para screening de aneuploidías.

	DGP con análisis de 5-7 cromosomas				DGP con análisis de 9-12 cromosomas			
	01/2007-2/2007 (32 centros)		01/2008-2/2009 (33 centros)		01/2007-2/2007 (32 centros)		01/2008-12/2009 (33 centros)	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ciclos	141		10		1458		3412	
Ovocitos inseminados	1450	-	83	-	12965	-	25788	-
Ovocitos fecundados	1197	82.5	65	78.3	8987	69.3	18213	70.6
Embriones biopsiados	596	49.8	49	75.4	6236	69.4	13159	72.5
Embriones con diagnóstico	546	91.6	44	89.8	5999	95.8	12729	96.7
Embriones Normales	173	32.0	17	38.6	1738	29.0	4177	32.8

## DGP PARA REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS

La tabla V muestra los resultados embriológicos de los ciclos de DGP realizados en pacientes portadores de reorganizaciones cromosómicas

así como el desglose según el tipo de reorganización. Se llevaron a cabo un total de 330 ciclos. Un 56.1% de los ciclos corresponden a translocaciones recíprocas, un 38.8% a translocaciones robertsonianas y un 5.1% a inversiones cromosómicas. El porcentaje de

embriones normales/equilibrados obtenidos varía en función del tipo de reorganización estudiada, siendo del 44.4% en inversiones, del 40% en translocaciones robertsonianas y del 23.3% en las translocaciones recíprocas.

**Tabla V.** Resultados embriológicos de los ciclos de DGP para reorganizaciones cromosómicas.

	TROB		TREC		INV		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ciclos	128	38.8	185	56.1	17	5.1	330	-
Ovocitos inseminados	1270	-	1881	-	172	-	3323	-
Ovocitos fecundados	912	71.8	1373	73.0	128	74.4	2413	72.6
Embriones biopsiados	680	74.5	1033	75.2	101	78.9	1814	75.2
Media embriones biopsiados/ciclo	5.3	-	5.6	-	6	-	5.5	-
Embriones con diagnóstico	655	96.3	992	96	99	98	1746	96.3
Embriones normales/equilibrados	262	40	231	23.3	44	44.4	537	30.8

La tabla VI muestra los resultados clínicos tras la aplicación del DGP en este grupo de pacientes. Se muestra una tasa de embarazo positivo por transferencia del 39.6% superior a la presentada en la última publicación de los datos europeos registrados por

el PGD *consortium* (34%; Harper et al., 2010).

### DGP PARA ENFERMEDADES MONOGENÉTICAS

Se han realizado un total de 328 ciclos de DGP para enfermedades

monogénicas. En la tabla VII pueden observarse los resultados embriológicos de los ciclos de DGP por enfermedades monogénicas desglosados en función del tipo de herencia.

**Tabla VI.** Resultados clínicos tras DGP para reorganizaciones cromosómicas.

	TROB		TREC		INV		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ciclos	128	38.8	185	56.1	17	4.9	330	-
Transferencias	91	71.1	111	60	15	88.2	217	65.7
Media embriones transferidos	1.8	-	1.6	-	2.1	-	1.3	-
Embarazos positivos	41	45	39	35.1	6	40	86	39.6
Únicos	27	65.8	30	76.9	3	50.0	60	69.8
Gemelares	12	29.3	6	15.4	3	50.0	21	24.4
Múltiples	2	4.9	3	7.7	0	-	5	5.8
Abortos	2	4.9	10	25.6	1	16.6	13	15.1
Recién nacidos vivos	50	55	32	28.9	7	46.6	62	28.6

**Tabla VII.** Resultados embriológicos de los ciclos de DGP para enfermedades monogénicas

	Dominantes		Recesivas		Ligadas al X		HLA-matching		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ciclos	147	-	91	-	77	-	13	-	328	-
Ovocitos inseminados	1933	-	1032	-	846	-	118	-	3929	-
Ovocitos fecundados	1428	73.9	785	76.0	618	73.0	99	83.9	2930	74.6
Embriones biopsiados	985	69.0	584	74.4	416	67.3	61	61.6	2046	69.8
Media embriones biopsiados/ciclo	6.7	-	6.5	-	5.4	-	4.7	-	6.2	-
Embriones con diagnóstico	868	88.1	527	90.2	382	91.8	58	95.1	1835	89.7
Embriones transferibles	407	46.9	322	61.1	223	58.4	8	3.5	960	52.3

**Tabla VIII.** Resultados clínicos globales de DGP para enfermedades monogénicas

	Dominantes		Recesivas		Ligadas al X		HLA-matching		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ciclos	147	-	91	-	77	-	13	-	328	-
Transferencias	128	87.1	82	90.1	70	90.9	7	53.8	287	87.5
Media embriones transferidos	1.8	-	1.8	-	1.7	-	1.1	-	1.1	
Embarazos positivos	41	32.0	33	40.0	28	40.0	0	0	102	35.5
Únicos	28	68.3	22	63.3	16	57.1	0	0	66	64.7
Gemelares	12	29.3	11	36.7	12	42.8	0	0	35	34.3
Múltiples	1	2.4	0	0	0	0	0	0	1	1
Abortos	11	26.8	5	13.3	7	25	0	0	23	22.5
Recién nacidos vivos	42	32.8	35	42.7	30	42.8	0	0	107	37.3

Los resultados clínicos de estos ciclos pueden observarse en la Tabla VIII. El porcentaje global de ciclos que llegan a transferencia es del 87.5% y la tasa de embarazo por transferencia es del 35.5%, siendo ligeramente superior a la descrita en la última recogida del registro europeo (31.3%; Harper et al., 2010). Sin embargo la tasa de aborto observada en esta recogida del GiGR resulta superior (22.5%) a la descrita en la última serie del PGD Consortium (12.4%; Harper et al., 2010).

De los 13 ciclos de DGP para selección de embriones histocompatibles (HLA), en tres casos únicamente se realizó la selección embrionaria por tipaje HLA, mientras que en los 10 casos restantes fue en combinación con la detección de otra enfermedad (4 casos de Adrenoleucodistrofia, 4 casos de Beta-Talasemia, 1 caso de Anemia de Fanconi y 1 caso de Blackfan Diamond).

En la Tabla IX se comparan los datos obtenidos en el período de actividad del 1 de enero de 2008 al 31 de diciembre

de 2009 recogidos por el GiGR con la última recopilación publicada por el PGD Consortium referente a ciclos realizados en el año 2007 (Harper et al., 2010). Cabe destacar que España es el país con una mayor participación de centros que envían datos al PGD Consortium. Aún así, en el último registro sólo catorce centros de España han aportado sus datos al registro europeo, en comparación con los 33 centros participantes en la recogida promovida por el GiGR.

**Tabla IX.** Comparativa de los resultados de DGP recogidos por el GiGR realizados durante el período 01/2008-12/2009 vs los resultados de DGP europeos recogidos por el PGD Consortium realizados durante el período 01/2007-12/2007 (Data collection X).

	ANEUPLOIDÍA				REORGANIZACIONES CROMOSÓMICAS				MONOGÉNICAS			
	GiGR		ESHRE PGD CONSORTIUM		GiGR		ESHRE PGD CONSORTIUM		GiGR		ESHRE PGD CONSORTIUM	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Ciclos	3422		3733		330		698		328		1182	
Transferencias	1903	55.6	2638	70.7	217	65.7	450	64.5	287	87.5	952	80.5
Embarazos positivos	731	38.4	781	30	86	39.6	152	34	102	35.5	298	31.3
Abortos	124	17.0	93	11.9	13	15.1	18	11.8	23	22.5	37	12.4

Aunque los ciclos incluidos en las dos recogidas de datos no comprenden el mismo período de tiempo, de los datos obtenidos se desprende que las tasas de embarazo conseguidas tras la aplicación de DGP en nuestro país son satisfactorias y superiores a las descritas en el registro europeo en los ciclos de DGP para *screening* de aneuploidías (38.4% vs 30.0%). Por el contrario, la tasa de aborto obtenida es superior a la registrada en los datos presentados por el PGD *consortium* en los ciclos de DGP para *screening* de aneuploidías (17.0% vs 11.9%) y para enfermedades monogénicas (22.5% vs 12.4%).

Para poder tener una visión real y más detallada de lo que está sucediendo a nivel de DGP en España es necesaria la participación de todos los centros que

realizan dicha actividad. Es por ello que desde el GiGR se está invirtiendo esfuerzos en la mejora del sistema de recogida de los datos con el objetivo de facilitar a los centros dicha recogida y poder contar con los máximos datos posibles.

## AGRADECIMIENTOS

A los centros participantes: AISA Reproducción, CEFIVA, Centro Ginecológico de León, Centro Gutemberg, Centro Médico Teknon, CIRH Lleida, Clínica Eugin, Clínica Sagrada Familia, Clínica Tambre, CREA, Fecunmed, Fertilab, FIV Madrid, Fundació Puigvert, GINEFIV, IERA, IMARA, Instituto Marquès, Institut Universitari Dexeus, IVI Alicante, IVI Almería, IVI Barcelona, IVI Bilbao, IVI

Madrid, IVI Murcia, IVI Valencia, IVI Sevilla, IVI Vigo, Procreatec, Quirón Barcelona, Quirón Bilbao, Quirón Madrid.

A los miembros del GiGR, en especial al Dr. J. Blanco, a la Dra C. Camprubí y al Dr. F. Bronet por la revisión crítica del documento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Harper JC et al. (2010). ESHRE PGD *consortium* data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. Hum Reprod 25 (11): 2685-2707.



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

## VI Curso ESHRE de Análisis Básico de Semen

*Sede: Hospital de Galdakao- Usansolo*

*Fechas: 18-21 de septiembre de 2012*

*Secretaría Técnica: Grupo Process (Megaprocess S. L.)*

*Email: [mjprieto@grupo-process.com](mailto:mjprieto@grupo-process.com)*

*<http://www.asebir.com/es/actividad-asebir/agenda/9>*

## II Diploma de Postgrado de Actualización en Técnicas de Reproducción Humana Asistida

*Sede: Institut Universitari Dexeus, Barcelona*

*Fechas: Septiembre 2012 hasta diciembre 2012*

*Más información: <http://www.uab.es/postgrau/> [http://www.dexeus.com/es\\_ES/profesionales-02-0.aspx](http://www.dexeus.com/es_ES/profesionales-02-0.aspx)*

*<http://www.asebir.com/es/actividad-asebir/agenda/9>*

## XV Máster de Biología de la Reproducción y Técnicas de Reproducción Humana Asistida

*Sede: Institut Universitari Dexeus y en la Unitat de Biologia Cel·lular de la Universitat Autònoma de Barcelona.*

*Fechas: Septiembre 2012 hasta septiembre 2013*

*Más información: <http://www.uab.es/postgrau/> [http://www.dexeus.com/es\\_ES/profesionales-02-0.aspx](http://www.dexeus.com/es_ES/profesionales-02-0.aspx)*

*<http://www.asebir.com/es/actividad-asebir/agenda/9>*

## EmbryoScope; Mejora de la Selección Embrionaria mediante *Time-Lapse*

*Sede: IVI Valencia I y II; Laboratorios de Embriología Clínica*

*Fechas: 15 de noviembre de 2012*

*Inscripción: [www.ividocencia.com](http://www.ividocencia.com)*

*<http://www.asebir.com/es/actividad-asebir/agenda/11>*

## 39 Symposium Internacional: Fertilidad 2012

*Sede: Auditorio Axa (Barcelona)*

*Fechas: 28-30 de noviembre de 2012*

*Secretaría Técnica: Fundació Santiago Dexeus Font*

*e-mail symposium: [fertilidad2012@dexeus.es](mailto:fertilidad2012@dexeus.es)*

*e-mail inscripciones: [inscripciones@dexeus.com](mailto:inscripciones@dexeus.com)*

*<http://www.asebir.com/es/actividad-asebir/agenda/11>*

## ASRM 2012

*American Society for Reproductive Medicine*

*68th Annual Meeting*

*October 20-24, 2012*

*San Diego, California*

*<http://www.asrm.org/annualmeeting.aspx>*

## 15th World Congress on Human Reproduction

*13-16 Marzo, 2013*

*Venecia, Italia*

*<http://www.humanrep2013.com/>*

## ASEBIR 2013

*VII Congreso Sevilla*

*Noviembre 2013*

## CERTIFICACIÓN ASEBIR

En enero de 2012 quedó abierta la 2ª Convocatoria para la Certificación ASEBIR en Reproducción Asistida Humana. Embriología Clínica.

La Vía Convalidación se dio por cerrada en marzo de 2011 y no se volverá a convocar, quedando únicamente dos vías disponibles:

- Certificación ASEBIR Vía Rápida
- Certificación ASEBIR Vía Mediante Examen

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

En el apartado de CERTIFICACIÓN ASEBIR de la sección de COMUNIDAD, encontraréis el nuevo documento con la Información General de la Certificación.

Os recomendamos su atenta lectura.

## SEGURO DE RESPONSABILIDAD CIVIL

Os comunicamos que desde finales de 2011 contamos con dos entidades aseguradoras (A.M.A y SEGURMEC) dispuestas a asegurar la responsabilidad civil de nuestra disciplina: Embriología Clínica.

Además, ambas entidades podrán informar sobre diferentes tipos de seguros (coche, multirriesgo, empresa, hogar...) proporcionando unos precios ventajosos para los asociados de ASEBIR.

## LA COMISIÓN DE SANIDAD DEL CONGRESO DE LOS DIPUTADOS ACEPTA POR UNANIMIDAD LA NECESIDAD DE LA CREACIÓN DE UNA ESPECIALIDAD PARA LA EMBRIOLOGÍA CLÍNICA

ASEBIR, en su deseo de conseguir el reconocimiento de la Embriología Clínica como una especialidad académicamente reglada, y como continuación a las reuniones mantenidas en legislaturas anteriores, se ha puesto en contacto con el actual ejecutivo del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Además de las reuniones establecidas

con representantes del presente Ministerio, se ha realizado una reunión informativa con la Comisión de Sanidad del Congreso de los Diputados, a cuyos miembros se les explicó la situación que existe en España en materia de Reproducción Asistida y en concreto en la Embriología Clínica.

La Comisión entendió y aprobó por unanimidad la petición de apoyo a la creación de una especialidad para la Embriología Clínica, formulada por los representantes de ASEBIR.

La comisión de especialidad de ASEBIR continúa con su ronda de contactos en aras a conseguir los apoyos sociales e institucionales suficientes para que la especialidad en Embriología Clínica sea una realidad lo antes posible.

## AULA EMB-ASEBIR

Del 19 al 21 de Abril de 2012 se celebró el I Practicum ASEBIR de Embriología Clínica en el ámbito del Aula EMB-ASEBIR, en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU), en Cáceres. En este curso, los estudiantes tomaron un primer contacto con las diversas técnicas de reproducción asistida, utilizando tanto material humano, como en el caso de los gametos masculinos, así como modelos animales, como los oocitos de ratón y cerdo. El desarrollo del curso fue óptimo, gracias a la colaboración de Equipos Médico-Biológicos (EMB) en la instalación y puesta a punto del equipamiento, y especialmente por la dirección y coordinación de Santiago Álvarez y José Mijares. El potencial del Aula EMB-ASEBIR, dentro de un centro de investigación y docencia como el CCMIJU (ver imágenes de la portada de este número), abre las puertas a posibilidades hasta ahora inéditas, como la de disponer de dos equipos completos para la micromanipulación y microinyección, lo que permitirá a los estudiantes entrenarse de forma intensiva en técnicas como la ICSI, IMSI, biopsia de blastómeras, etc. La Vocalía de Formación y Docencia ya está trabajando en la organización de los próximos cursos del Aula EMB-ASEBIR que, sin duda, serán de gran interés para nuestros asociados.

## CERTIFICADO DE GESTIÓN AMBIENTAL DE LA REVISTA ASEBIR

Actualmente, la impresión en papel de la Revista ASEBIR que realiza Góbalos cumple con el Certificado de Gestión Ambiental, en el que se cumple con la Cadena de Custodia, que es la manera de garantizar la trazabilidad del origen del papel. FSC (*Forest Stewardship Council* o Consejo de Administración Forestal) y PEFC (*Program for the Endorsement of Forest Certification Schemes* o Programa para la Promoción de Esquemas de Certificación Forestal), son organizaciones internacionales, independientes, sin ánimo de lucro, cuyo objetivo es promover la gestión forestal responsable desde el punto de vista medioambiental y social. Estas organizaciones, mediante organismos de certificación, aprueban los sistemas de trazabilidad y gestión del producto de las empresas que conforman la Cadena de Custodia y que garantizan el proceso de fabricación, desde el bosque hasta el impreso. Góbalos y ASEBIR, por su respeto al medio ambiente, consideran la Cadena de Custodia como una garantía de transparencia en la aplicación del papel en los trabajos impresos.

## INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES. NORMAS DE PUBLICACIÓN

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

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

- Antes del 31 de Marzo para el primer número del año (Junio)
- Antes del 30 de Septiembre para el segundo número del año (Diciembre).

### MANUSCRITOS:

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

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

En la primera página de todos los trabajos se indicará, en el siguiente orden: título en castellano; título en inglés; nombre y un apellido de cada uno de los autores y su centro de trabajo, y correo electrónico del primer autor. En la segunda página se incluirá un resumen y

las palabras clave (ambos en castellano e inglés). Los autores se asegurarán de que las palabras clave, tanto en inglés como en español, se encuentren en los tesauros correspondientes del MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) y de la base de datos de BIREME (enlace "Consulta al DeCS" en <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>), respectivamente.

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

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

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

### A) ARTÍCULO DE REVISTA CON MENOS DE 6 AUTORES:

Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* 1993; 59:418-423.

### B) ARTÍCULO DE REVISTA CON MÁS DE 6 AUTORES:

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

### C) LIBRO COMPLETO:

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

### D) CAPÍTULO DE LIBRO:

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

### E) COMUNICACIÓN A CONGRESO:

Bengston S, Solheim. Hatching assisted. XXII Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology; 1997 Jun 20-23; Roma, Italia. p. 1561-2.

Para la sección de debate se aceptarán textos (de no más de dos hojas DIN A4 a 30 líneas, incluidas un máximo de cinco citas bibliográficas y dos figuras si las hubiere), que reflejen la opinión de los diferentes firmantes sobre el tema de discusión que se propondrá en el número de la revista anterior.

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

# Soluciones que van allá

Oferta exclusiva para  
**Colegiados**



## UN SEGURO DE AUTO DISEÑADO PARA TI<sup>(1)</sup>

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

Además, tendrás coberturas

### EXTRA PARA COLEGIADOS

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

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

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

Llama ahora al  
**944 354 600**  
e infórmate

Teléfono exclusivo para  
Colegiados comercializado  
por SegurMec



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

**ASEBIR**  
Asociación para el Estudio  
de la Biología de la Reproducción



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

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

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

REVISTA DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ASEBIR

asebir@asebir.com | www.asebir.com

